

THESIS

MUNICH

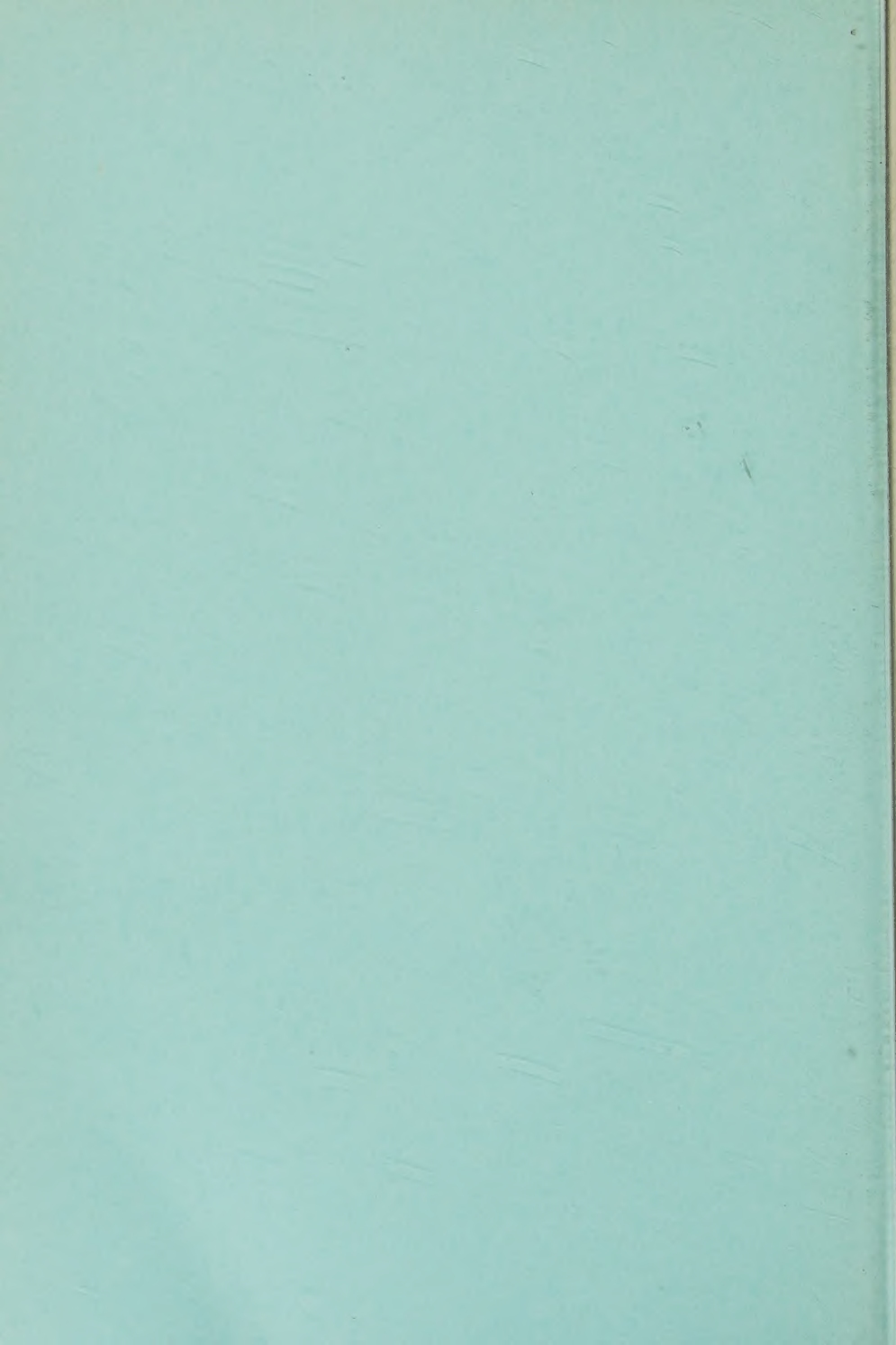
1966

SANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR DRIVE  
PALO ALTO, CALIF.

# Zur Beziehung zwischen Milz und Knochenmark unter der Einwirkung von Röntgenstrahlen

PETER HEIDENREICH

1966



Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München  
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

ZUR BEZIEHUNG ZWISCHEN MILZ UND KNOCHENMARK UNTER DER  
EINWIRKUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Peter Heidenreich  
aus München

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer
  2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Butenandt
- Dekan: Professor Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1966

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer im Max-Planck-Institut für Biochemie, München, in der Zeit von September 1963 bis Juli 1965 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Herrn D. Rosefeldt für seine Hilfe bei der Anfertigung der Gewebekulturen.

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                           | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| EINLEITUNG                                                                                                                                                                                                                                | 1     |
| METHODIK                                                                                                                                                                                                                                  | 5     |
| Tiere - Futter - Bestrahlung                                                                                                                                                                                                              | 5     |
| Zur Austestung der Versuche angewandte Methoden:                                                                                                                                                                                          |       |
| a) Untersuchungen über die Einbaurate von $^{32}\text{P}$ in das Knochenmark bestrahlter Ratten in der Gewebekultur.                                                                                                                      | 6     |
| b) Untersuchungen über die Wirkung von Plasma verschieden vorbehandelter Ratten und von Milz- und Pankreasdesoxyribonuklease auf die $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmark-, Milz- und Lebergewebe von Ratten.                        | 7     |
| c) Untersuchungen über den Gehalt an Milzdesoxyribonuklease in Milz und Plasma von normalen und mit 800 R ganzkörperbestrahlten Ratten und von Kaninchen, deren Milz mit 400 R lokal bestrahlt wurde.                                     | 9     |
| d) Untersuchungen über die Absterberate von ganzkörperbestrahlten Ratten und Mäusen (650 R) nach Injektion von Kochsalzlösung, eines Kochsalzlösungs-Äthanolgemisches und einer hämatologisch aktiven Lipoidfraktion aus Säugetiermilzen. | 10    |
| ERGEBNISSE                                                                                                                                                                                                                                | 13    |
| I) Mit der Methode der Gewebezucht erfaßbare Änderungen der Proliferationsfähigkeit von Rattenknochenmark                                                                                                                                 | 13    |
| a) Der Einfluß der Fütterung auf den $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten                                                                                                                                                | 13    |
| b) Die Wirkung von Milz- und Pankreasdesoxyribonuklease auf die $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmarkszellen in vitro und ihr Nachweis in Milz und Plasma bestrahlter Ratten und Kaninchen                                            | 14    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark bestrahlter Ratten                                                                                                                                                                                          | 15 |
| a) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden.                                                                                                                                                        | 15 |
| b) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, nachdem ihre Milz 24 Stunden vor der Bestrahlung am Hilus unterbunden worden war.                                                                      | 15 |
| c) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, nachdem ihre Milz 24 Stunden vor der Bestrahlung am Hilus unterbunden und zusätzlich noch in einen Beutel aus Polyäthylenfolie eingebunden worden war. | 17 |
| d) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, und deren operativ freigelegte Milz während der Bestrahlung mit Blei abgeschirmt wurde.                                                                | 18 |
| III) Untersuchungen über die Rolle von Milzfaktoren für den $^{32}\text{P}$ -Einbau in Knochenmark und Milzgewebe von Ratten                                                                                                                                   | 18 |
| a) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, deren Milz mit 800 R lokal bestrahlt wurde.                                                                                                                                                      | 18 |
| b) Die Wirkung von Plasma ganzkörperbestrahlter Ratten auf den $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark und das Milzgewebe nicht bestrahlter Ratten.                                                                                                         | 20 |
| c) Die Wirkung von Plasma von lokal milzbestrahlten Ratten auf die $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmark nicht bestrahlter Ratten.                                                                                                                         | 20 |
| d) Die Wirkung einer gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen auf die $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von normalem Knochenmark-, Milz- und Lebergewebe von Ratten in vitro.                                                                                       | 20 |

|                                                                                                                                                                                                                                           | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| IV) Die Wirkung einer gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen auf die Absterberate ganzkörperbestrahlter Ratten und Mäuse                                                                                                             | 21    |
| a) Vergleich der Absterberate ganzkörperbestrahlter Mäuse mit der von Mäusen, die nach der Bestrahlung Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung und Äthanol oder von Kochsalzlösung, Äthanol und der Lipoidfraktion erhalten haben. | 21    |
| b) Vergleich der Absterberate ganzkörperbestrahlter, normaler Ratten mit splenektomierten Ratten nach einer Injektion einer gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen.                                                                  | 23    |
| BESPRECHUNG                                                                                                                                                                                                                               | 24    |
| ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                                                                                                                                           | 35    |
| LITERATUR                                                                                                                                                                                                                                 | 37    |

Die ersten Berichte über die Strahlenreaktion der Milz und ihre Bedeutung für den Gesamtorganismus, besonders aber für das blutbildende System, liegen bereits über 60 Jahre zurück (1). Seitdem wurde eine große Anzahl von Befunden erhoben, die die Schwierigkeiten deutlich machen, diese komplizierten Vorgänge zu durchschauen. Auch heute noch gilt in vieler Hinsicht Galens Ausspruch, der die Milz als ein "mysterii plenum organum" bezeichnete.

Bei den klinisch und experimentell erhobenen Befunden über die normale Physiologie der Milz gehen die Meinungen vorwiegend bei dem Punkte der humoralen Beeinflussung der Myelopoese auseinander. Es wurden sowohl Knochenmark-hemmende als auch Knochenmark-fördernde Faktoren wahrscheinlich gemacht (2 - 4). Die Befunde, die eine Knochenmarkhemmung ergaben, sind in der Überzahl. Es ist aber noch nicht gelungen, einen dieser Faktoren zu isolieren.

Der Einfluß der Milz auf den bestrahlten Säugetierorganismus ist besser gesichert. Als Methode dient hier besonders die Bestimmung der Überlebensrate der Tiere innerhalb 30 Tage nach der Bestrahlung. Die Überlebenszeit milznormaler, ganzkörperbestrahlter Tiere wird verglichen mit der Überlebenszeit

- 1) von Tieren, die verschiedene Zeit vor oder nach der Bestrahlung splenektomiert wurden (5 - 9),
- 2) von Tieren, deren Milz lokal bestrahlt wurde (5,10),
- 3) von Tieren, deren Knochenmark weitgehend oder deren Milz während einer Ganzkörperbestrahlung durch Blei geschützt war,
- 4) von Tieren, denen Knochenmarks- oder Milzzellen (5,11 - 14) oder
- 5) zellfreies Knochenmarks- oder Milzzellhomogenat (15 - 20) oder
- 6) Blut zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung injiziert wurden (21,22).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten auf einen ungünstigen Einfluß der bestrahlten Milz auf den bestrahlten Organismus hin, der sich offenbar in erster Linie auf die Blutbildung auswirkt. Die Entfernung der Milz bei Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und Hunden bewirkt nämlich in dem Zeitraum von 14 Tagen vor einer Bestrahlung bis 48 Stunden danach einen günstigen Effekt auf den Verlauf der Strahlenkrankheit (5 - 8, 35 - 41). Die Splenektomie scheint nur dann erfolgreich zu sein, wenn der Tod der Tiere vorwiegend eine Folge des hämatologischen Strahlenschadens ist.

Eine intravenöse Injektion von Äthylpalmitat 48 Stunden vor einer Ganzkörperbestrahlung hat bei Mäusen ebenfalls eine Strahlenschutzwirkung. Durch diese "chemische Splenektomie" kommt es vorübergehend zu einer destruktiven Milzveränderung, die sich wie eine operative Milzentfernung auswirkt (42 - 44).

Histologisch zeigte sich weiter, daß sich das Knochenmark von splenektomierten Ratten nach Ganzkörperbestrahlung schneller erholt, daß aber eine Bestrahlung der Milzregion die Regeneration des strahlengeschädigten Knochenmarks nach lokaler Bestrahlung der hinteren Extremitäten verzögert (31,33,45).

Andererseits gibt es eine Reihe von Befunden über die günstige Wirkung der strahlengeschützten Milz, bzw. von Milzimplantaten, Milzzellsuspensionen oder Milzhomogenaten auf die Überlebensrate der Tiere. Die Erhöhung der Überlebensrate durch eine Milzabdeckung während der Bestrahlung oder durch Milzimplantation und Injektion von Milzzellen nach einer Bestrahlung könnte darauf beruhen, daß mitosefähige Milzzellen zu Zentren der Blutbildung werden.

Die Schutzwirkung ist jedoch nicht nur an die intakte Milzzelle gebunden, denn Homogenate (17,18,23 - 26) und sogar bestimmte Fraktionen daraus (19,27 - 29) besitzen denselben Schutzeffekt. Durch diese humorale Stimulierung wird zwar die initiale Schädigung des Knochenmarks bei den ganzkörper-

bestrahlten Tieren nicht verhindert, aber die Regeneration des blutbildenden Gewebes setzt durch die Behandlung früher ein (23,24,30 - 34).

Bei der Beziehung der Milz zum Knochenmark nach Einwirkung energiereicher Strahlen interessiert besonders der Nachweis biologischer Strahlenschäden an diesen sehr strahlenempfindlichen Organen schon kurze Zeit nach der Bestrahlung, denn die Überlebensrate der Tiere ist nur eine Folge verschiedener, schon während oder bald nach einer Strahleneinwirkung eintretender Reaktionen. Besonders an den blutbildenden Geweben lassen sich infolge ihrer großen Teilungsaktivität frühzeitig Veränderungen nach einer Bestrahlung nachweisen. So treten schon 30 Minuten nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 500 R<sup>60</sup> Co-Strahlen elektronenoptisch erkennbare, histologische Veränderungen der Knochenmarkszellen auf, die 1 Stunde (46) und 3 Stunden (47) nach der Bestrahlung noch stärker ausgeprägt sind. Man findet eine Schwellung der Mitochondrien verbunden mit Fragmentierung und Verklumpung der Cristae (46). Ähnliche Veränderungen lassen sich an der Mäusemilz 1 Stunde nach einer Bestrahlung mit 1000 R nachweisen (48). Die Folge ist ein sofortiger Zelluntergang oder ein latenter Zellschaden, der sich erst bei der nächsten Mitose manifestiert, je nach Empfindlichkeit der Stoffwechselphase, in der sich die Zelle gerade befindet (49).

In der Milz steht schon wenige Stunden nach einer Bestrahlung der rasche Zellzerfall in den Lymphfollikeln im Vordergrund (1,50). Als Ursache dieses Zelltodes in der Milz wie in dem ebenso strahlensensiblen Thymus, wird die Aktivierung von Enzymen diskutiert. So wird der Anstieg an freien Aminosäuren in der Mäusemilz 1 Stunde nach der Bestrahlung mit 690 R als Folge einer Aktivierung proteolytischer Enzyme gedeutet (51).

In der Rattenmilz bedingt die ansteigende Adenosintriphosphataseaktivität ein starkes Absinken des ATP - und die Vermehrung des AMP - Gehalts bei gleichbleibendem ADP-Gehalt (52).

Die Veränderung ist in ihrem zeitlichen Auftreten dosisabhängig (53) und scheint mit der Zunahme des Prozentsatzes an Granulozyten einherzugehen (54).

Im Rattenthymus ist schon 1 Stunde nach einer 800 R-Ganzkörperbestrahlung eine zunehmende Labilisierung der DNS-Proteinbindung zu beobachten, die wohl eine Folge der Desoxyribonukleaseaktivierung darstellt (55 - 57).

In vorliegender Arbeit werden mit der Methode der Gewebezucht an Milz und Knochenmark von Ratten strahlenbedingte biologische Frühveränderungen bis zu 6 Stunden nach einer Röntgenbestrahlung und die gegenseitige Beeinflussung dieser Organe untersucht.

Ferner wird eine Bestimmung des Desoxyribonukleasegehaltes der Milz und eine Untersuchung seiner Bedeutung beim Strahlenschaden durchgeführt. In weiteren Experimenten wird der Einfluß einer Lipoidfraktion aus Säugetiermilzen auf Milz und Knochenmark in vitro und ihre Bedeutung beim Strahlenschaden von Ratten und Mäusen untersucht.

## Methoden

### I) Tiere

Für die Versuche dienten 6 - 8 Wochen alte weibliche Sprague-Dawley-Ratten, die durchschnittlich 120 g schwer waren, und etwa 8 Wochen alte weibliche weiße NMRI-Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 20 g. Die verwendeten Kaninchen waren phänotypisch verschieden und wogen 3 - 4 kg.

### II) Futter

Ratten und Mäuse erhielten als Futter "Hope Farms - Standart Laboratory Diet R.M.H. -B", die Kaninchen "Hope Farms - Standart Laboratory Rabbit Diet - L.K. 01" der Fa. Hope Farms (Leiden/Niederlande) und Wasser ad libitum. Nur für die vergleichenden Fütterungsversuche mit Ratten wurde "Altromin-M, Alleindiät für Mäuse (spezial)" und "Altromin-R, Alleindiät für Ratte und Maus" der Fa. Altrogge (Lage/Lippe) verwendet.

### III) Bestrahlung

Die Röntgenbestrahlung wurde mit zwei verschiedenen Geräten vorgenommen:

a) Ein C.H.F. Müller-Gerät, Typ MG 300, wurde bei den Untersuchungen über den <sup>32</sup>P-Einbau in das Knochenmark bestrahlter Ratten unter folgenden Bedingungen verwendet: 300 KV, 10 mA, 0,9 mm Cu- und 1,0 mm Al-Filter, Fokus-Tier-Abstand 50 cm, Dosisleistung 60 R/min, Gesamtdosis immer 800 R.

b) Alle anderen Bestrahlungen wurden mit einem Siemens Stabilipan-Gerät vorgenommen. Bedingungen: 280 KV, 10 mA, 1,0 mm Cu-Filter, Fokus-Tier-Abstand 50 cm, Dosisleistung 65 R/min. Die Dosis über dem Bestrahlungsfeld war einheitlich mit einer Streuung von  $\pm 4\%$ . Sie wurde mittels einer Ionisationskammer (Duplex-Normalkammer) an einem Duplex-Dosimeter gemessen. Die Eichung erfolgte mit einem Radiumelement. Die durchschnittliche Meßgenauigkeit betrug  $\pm 2\%$ .

Während der Bestrahlung saßen die Ratten einzeln, die Mäuse zu zweit in einem in Fächer unterteilten kreisrunden Käfig mit Plexiglasdeckel ohne wesentliche Bewegungsmöglichkeit.

Zur Durchführung der lokalen Milzbestrahlung wurde den Ratten und Kaninchen in Evipannarkose (Ratten 100 mg Evipan/kg Körpergewicht, Kaninchen 125-175 mg/kg Körpergewicht i.p.) die Bauchhöhle durch einen kurzen Schnitt eröffnet, die Milz an ihrem Hilus mobilisiert und aus der Bauchhöhle herausluxiert. Jedes Tier wurde daraufhin mit 4,0 mm dicken Bleiplatten so abgedeckt, daß die Milz außerhalb des Bleischutzes zu liegen kam.

Bei den Versuchen mit der bleigeschützten Milz wurde ebenso verfahren, nur wurden die Ratten in Seitenlage fixiert und ihre operativ freigelegten Milzen mit ebenfalls 4,0 mm dicken Bleiplatten abgedeckt.

Splenektomie, Milzunterbindung und Milzunterbindung mit Einschluß der Milz in einen Beutel aus Polyäthylenfolie (Dicke: 0,05 mm) erfolgte jeweils einen Tag vor der Bestrahlung in Äthernarkose.

In bestimmten Abständen nach Bestrahlungsende wurden die Ratten in Äthernarkose getötet und das Knochenmark aus Tibia und Femur entnommen. Blut wurde während der Narkose mittels einer Spritze unter Zusatz von Heparin aus der Aorta abdominalis gewonnen.

Zur Austestung wurden folgende Methoden angewandt:

- a) Untersuchungen über die Einbaurate von  $^{32}\text{P}$  in das Knochenmark bestrahlter Ratten in der Gewebekultur.

Die Züchtung des Knochenmarkgewebes erfolgte nach einer von Trowell (58) angegebenen Methode in Petrischalen auf silikonisiertem Papier. 20 - 25 etwa  $1\text{ mm}^2$  große Knochenmarksexplantate wurden bei  $37^\circ$  in einem Medium inkubiert, das zu 75% aus Hanks-Lösung und zu 25% aus Plasma unbestrahlter Ratten bestand. Die  $^{32}\text{P}$ -Konzentration des Mediums, das als  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  angeboten wurde, betrug 0,1 - 0,15  $\mu\text{C/ml}$ .

Zu jedem Versuchsansatz wurde das Knochenmark von 2 Tieren zusammengefaßt, um individuelle Schwankungen möglichst auszuschalten. Als Kontrollen diente zu jedem Versuch Knochenmark von 4 - 6 unbestrahlten, gesunden Tieren. Aus den so gebildeten 2 - 3 Kontrollansätzen wurde der Mittelwert jeweils als Kontrollwert verwendet und mit 100% angesetzt. Die Fehlerbreite betrug  $\pm 8\%$ .

Nach 15-stündiger Inkubation wurden die Explantate für 2 Stunden in 5 ml Hanks-Lösung gebracht, um das adsorbierte Phosphat zu lösen, und dann unter einer Rotlichtlampe getrocknet.

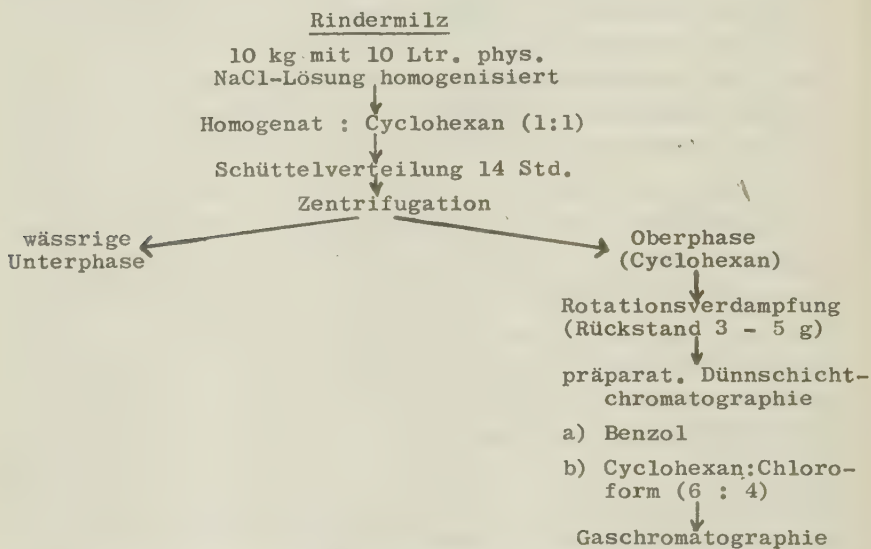
Das Gewicht des Gewebes wird durch seinen unterschiedlichen Anteil an Fettzellen beeinflusst. Deshalb wurde, um eine verlässliche Beziehung zwischen dem Trockengewicht des Knochenmarks und der aufgenommenen Phosphatmenge herstellen zu können, das getrocknete Gewebe zerrieben und das Fett mit Petroläther extrahiert. Die Menge von ungefähr 1 mg des pulverisierten Gewebes wurde gewogen und die Aktivität mittels eines Geiger-Müller-Zählers gemessen. Von jedem Ansatz wurden 3 Proben hergestellt. Um das Pulver auf dem zur Messung verwendeten Metallplättchen zu befestigen, wurde ein darübergedecktes Gelatineplättchen durch einen Tropfen konzentrierter Ameisensäure zum Haften gebracht (59).

b) Untersuchungen über die Wirkung von Plasma verschieden vorbehandelter Ratten und von Milz- und Pankreasdesoxyribonuklease auf die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmark-, Milz- und Lebergewebe von Ratten.

Da das Medium für die Gewebekulturen aus einer Salzlösung und homologem Plasma besteht, ist die Methode auch für Untersuchungen von Plasmawirkungen und die Wirkung zugesetzter Stoffe geeignet.

Knochenmark von nicht bestrahlten, normalen Ratten wurde nach der oben beschriebenen Methode in der Gewebekultur mit Plasma von Ratten inkubiert, das 1 Stunde nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R entnommen worden war. Ebenso wurde die

Wirkung einer hämatologisch aktiven Lipoidfraktion aus Rindermilzen (60,61) auf Rattenknochenmark in vitro getestet. Die Aufarbeitung der Rindermilzen und die Herstellung der gereinigten Lipoidfraktion ist aus folgendem Schema ersichtlich (62):



Die in Cyclohexan und Ölsäure gelöste Lipoidfraktion wurde durch Abdampfen des Cyclohexans im Rotationsverdampfer in eine injektionsfähige Form gebracht. Jedes Tier erhielt in Äthernarkose eine Injektion von 50 µg dieses Faktors in 0,05 ml Ölsäure in die Vena femoralis injiziert. Das Blut wurde 1 oder 2 Stunden nach der Injektion aus der Abdominalaorta entnommen und das durch Zentrifugieren gewonnene Plasma den Knochenmarkkulturen zugesetzt. Die Plasmakonzentration im Kulturmedium betrug wie in den Kontrollen 25%.

Milz- und Lebergewebe wurde normalen Spendertieren steril entnommen, in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Explantate zerschnitten und in einem Medium, das zu 75% aus Hanks-Lösung und zu 25% aus homologem Plasma bestand, in Rollerröhrchen 15 Stunden lang bei 37° inkubiert. Kontrollversuche mit Plasma unbehandelter Ratten wurden jeweils mit den Milzen und Lebern derselben Tiere

durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung des Gewebes und die Auswertung der Versuche erfolgte wie bei den Knochenmarkskulturen.

Pankreas- und Milzdesoxyribonuklease (Sigma-Chemie) wurde den Kulturen normalen Knochenmarks mit Normalplasma in Konzentrationen von 0,1-50,0 µg/ml zugesetzt.

c) Untersuchungen über den Gehalt an Milzdesoxyribonuklease in Milz und Plasma von normalen und mit 800 R ganzkörperbestrahlten Ratten und von Kaninchen, deren Milz mit 400 R lokal bestrahlt wurde.

Verschiedene Zeit nach der Bestrahlung wurde den Ratten in Äther-, den Kaninchen in Evipannarkose die Milz und das Blut entnommen und sofort in Eiswasser gekühlt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bis zur Inkubation bei + 4°.

Milzen: Je zwei Milzen von Ratten und eine vom Kaninchen wurden mit einem Potter-Homogenisator homogenisiert, 10 Min scharf zentrifugiert, und der Überstand auf seinen Milzdesoxyribonuklease-Gehalt mit einer nach (63) modifizierten Methode getestet. Als Substrat diente Kalbsthymusdesoxyribonukleinsäure (DNS)<sup>+</sup>.

Ein Inkubationsansatz bestand aus:

0,5 ml Überstand, 6 ml Phosphatpuffer (nach Sörensen P<sub>H</sub> 4,8), 0,5 mg DNS in 0,5 ml Puffer.

Die Enzymreaktion wurde verschiedene Zeit nach der Inkubation im Wasserbad bei 37° unter fortwährendem Schütteln durch die Zugabe von 1 ml einer eisgekühlten, 12%igen Perchlorsäure beendet und die Mischung 15 Minuten in Eiswasser stehengelassen. Der säurelösliche Anteil wurde dann über den Schleicher und Schüllfilter Nr. 1575 abfiltriert und die Zunahme der säurelöslichen Nukleotide in einem Zeiss UV-Spektrophotometer bei der Wellenlänge 260 µm bestimmt.

Zu jedem Versuch wurden Kontrollbestimmungen mit Milzen unbe-strahlter Tiere durchgeführt.

---

+ Ich danke Herrn Dr. Zillig für die Überlassung der Kalbsthymus-DNS.

Plasma: Die Milzdesoxyribonuklease-Bestimmung im Plasma der bestrahlten Tiere erfolgte nach derselben Methode. Dazu wurde jeweils das durch Zentrifugieren in der Kälte gewonnene Plasma von 2 - 6 Ratten, bzw. von einem Kaninchen gesammelt, gemischt und in folgender Konzentration mit dem Substrat inkubiert:

0,5 ml Plasma, 3 ml Puffer, 0,5 mg DNS in 0,5 ml Puffer.

Die Zunahme der Absorption im UV-Licht nach einstündiger Inkubation wurde in % der entsprechenden Kontrollwerte ausgedrückt; der Kontrollwert wurde zu 100% gesetzt.

- d) Untersuchungen über die Absterberate von ganzkörperbestrahlten Ratten und Mäusen (650 R) nach Injektion von Kochsalzlösung, eines Kochsalzlösung-Äthanolgemisches und einer hämatologisch aktiven Lipoidfraktion aus Säugtiermilzen.

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 1248 weiblichen Mäusen und an 550 weiblichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt.

α) Mäuse:

Die bestrahlten Tiere wurden bei zweien der 3 Versuche in 3 Gruppen geteilt:

Gruppe I: Sie besteht aus bestrahlten Tieren, die keine Injektion erhielten, und dient als Kontrollgruppe.

Gruppe II: Von dieser erhielt jedes Tier

a) unmittelbar nach der Bestrahlung und an den 9 folgenden Tagen je 3 µg der gereinigten Lipoidfraktion aus Säugtiermilzen oder 30 µg eines in Cyclohexan löslichen Rohextraktes aus Rindermilzhomogenat, oder

b) zum ersten Mal 24 Stunden nach der Bestrahlung und an den folgenden 9 Tagen je 3 µg der Milzlipoidfraktion intraperitoneal injiziert. Dazu wurden 3 µg der Milzlipoidfraktion in 0,05 ml Äthanol aufgenommen und mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ml aufgefüllt.

Gruppe III: Die Tiere der dritten Gruppe dienten als Kontrolltiere zu Gruppe IIa und b.

Jede Maus erhielt 10 Injektionen von 1 ml eines Gemisches aus 0,95 ml physiol. Kochsalzlösung und 0,05 ml Äthanol (96%) an 10 aufeinanderfolgenden Tagen i.p.. Die erste Injektion erfolgte entweder unmittelbar oder erst 24 Stunden nach der Bestrahlung.

Ein dritter Versuch wurde vorgenommen, um zu prüfen, ob eine Wirkung des injizierten Äthanols auf die Überlebensrate der Mäuse besteht. Hierzu wurden Mäuse, die mit 650 R ganzkörperbestrahlt worden waren, in 4 Gruppen unterteilt. Es erhielt die 1. Gruppe unmittelbar nach der Bestrahlung 1 ml steriler physiol. NaCl-Lösung, die 2. Gruppe unmittelbar nach der Bestrahlung 3 ml steriler physiol. NaCl-Lösung, die 3. Gruppe 24 Stunden nach der Bestrahlung 1 ml steriler physiol. NaCl-Lösung, die 4. Gruppe 24 Stunden nach der Bestrahlung 3 ml steriler physiol. NaCl-Lösung.

### ß) Ratten:

Es wurden folgende 2 Versuchsreihen durchgeführt:

In der ersten Reihe wurden normale Ratten mit 650 R ganzkörperbestrahlt und in 3 Gruppen aufgeteilt.

Gruppe I: Sie dient als Kontrollgruppe; die Tiere erhielten keine Injektion.

Gruppe II: Von dieser erhielt jedes Tier entweder

- a) unmittelbar und 48 Stunden nach der Bestrahlung, oder
- b) 24 Stunden und 3 Tage nach der Bestrahlung je 10 µg der gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen in 1 ml Kochsalz-lsg.-Äthanolgemisch (0,95 ml physiol. NaCl-Lösung + 0,05 ml Äthanol 96%ig) i.p. gespritzt.

Für den zweiten Versuch wurden 175 Ratten zwischen dem 10. und 3. Tag vor der Bestrahlung splenektomiert. Jedes Tier erhielt einen Tag vor der Operation 3 mg Neosalvarsan in 1 ml steriler Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert, um eine mögliche Bartonelleninfektion im Anschluß an die Splenektomie zu verhindern.

Es wurden wieder 3 Gruppen gebildet, von denen Gruppe I eine nur bestrahlte Kontrollgruppe bildete, Gruppe II unmittelbar nach der Bestrahlung und nach 48 Stunden mit je 10  $\mu\text{g}$  der gereinigten Milzlipoidfraktion (in NaCl-Lsg.-Äthanol) gespritzt wurde, und Gruppe III nur mit je 1 ml des Kochsalzlösung-Äthanolgemisches unmittelbar und 48 Stunden nach der Bestrahlung injiziert wurde und damit die Kontrollgruppe zu Gruppe II bildete.

# Ergebnisse

## I) Mit der Methode der Gewebebezugt erfaßbare Änderungen der Proliferationsfähigkeit von Rattenknochenmark.

a) Der Einfluß der Fütterung auf den  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten.

Männliche und weibliche Sprague-Dawley Ratten aus gleichen Würfen wurden von Geburt an mit zwei verschiedenen Futtern aufgezogen. Eine Gruppe erhielt "Altromin-M, Alleindiät für Mäuse (spezial)", die andere "Altromin-R, Alleindiät für Ratte und Maus" und Wasser ad libitum.

| Versuch<br>Nr                 | $^{32}\text{P}$ -Einbau in % |             | Körpergewicht       |                        |                            |                         |                        |                            |                         |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|---------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                               | Altromin-M                   | Altromin-R  | Alter<br>in<br>Tage | „Altromin-M“           |                            |                         | „Altromin-R“           |                            |                         |
|                               |                              |             |                     | Zahl und<br>Geschlecht | Körper-<br>gewicht<br>in g | Mittel-<br>wert<br>in % | Zahl und<br>Geschlecht | Körper-<br>gewicht<br>in g | Mittel-<br>wert<br>in % |
| 1                             | 99                           | 64          | 61                  | 9 ♂                    | 233                        | $100 \pm 9$             | 24 ♂                   | 190                        | $82 \pm 8$              |
| 2                             | 99                           | 63          | 54                  | 19 ♂                   | 198                        | $100 \pm 15$            | 12 ♂                   | 150                        | $76 \pm 8$              |
| 3                             | 102                          | 56          | 54                  | 8 ♀                    | 175                        | $100 \pm 9$             | 12 ♀                   | 133                        | $76 \pm 9$              |
| 4                             | 103                          | 77          | 51                  | 10 ♀                   | 181                        | $100 \pm 7$             | 8 ♀                    | 143                        | $79 \pm 12$             |
| 5                             | 115                          | 84          | 51                  | 19 ♂                   | 207                        | $100 \pm 11$            | 10 ♂                   | 164                        | $79 \pm 11$             |
| 6                             | 86                           | 88          | 46                  | 11 ♀                   | 151                        | $100 \pm 11$            | 10 ♀                   | 119                        | $79 \pm 7$              |
| 7                             | 95                           | 68          | 41                  | 9 ♂                    | 155                        | $100 \pm 5$             | 17 ♂                   | 143                        | $93 \pm 17$             |
| 8                             | 103                          | 61          | 41                  | 13 ♀                   | 141                        | $100 \pm 10$            | 15 ♀                   | 121                        | $82 \pm 16$             |
| 9                             | 102                          | 93          |                     |                        |                            |                         |                        |                            |                         |
| Mittelwert<br>und<br>Streuung | $100 \pm 7$                  | $72 \pm 12$ |                     | 98                     | 180                        | $100 \pm 10$            | 108                    | 145                        | $81 \pm 11$             |

Tab. 1: Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark und das Körpergewicht von Ratten, welche mit 2 verschiedenen Futtern ernährt wurden.  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme nach 15-stündiger Inkubation in  $^{32}\text{P}$ -haltigem Medium. Angabe der spezifischen Aktivität/mg getrocknetem und extrahiertem Gewebe in % der Kontrollwerte. Kontrollwerte =  $100 \pm 8\%$ .

Von 6 - 8 Wochen alten Tieren beiderlei Geschlechts wurde nach der oben beschriebenen Methode Knochenmark gewonnen und mit  $^{32}\text{P}$  15 Stunden lang bei  $37^\circ$  inkubiert. Das Knochenmark der mit "Altromin-R" gefütterten Ratten zeigte gegenüber den mit "Altromin-M" gefütterten Tieren einen auf  $72 \pm 12\%$  erniedrigten Phosphateinbau. Vergleicht man das Körpergewicht der verschiedenen gefütterten Ratten gleichen Geschlechts und Alters, so erkennt man, daß die mit "Altromin-R" ernährten Ratten im Durchschnitt um 19% leichter sind (Tab. 1). Die Ursache dieses unterschiedlichen Wachstums ist wahrscheinlich in dem Gehalt an Kalorien und Ballaststoffen der beiden Futter zu suchen. "Altromin-M" besitzt z.B. um 43% mehr Rohfett, aber um 15% weniger Asche und um 53% weniger Rohfaser als "Altromin-R". Neben dem 8-fachen Gehalt an Vitamin  $\text{D}_3$  beträgt die Menge an Vitamin  $\text{B}_{12}$  und Folsäure gegenüber "Altromin-R" jedoch weniger als die Hälfte. Die Blutbildung scheint darunter nicht zu leiden.

- b) Die Wirkung von Milz- und Pankreasdesoxyribonuklease auf die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmarkszellen in vitro und ihr Nachweis in Milz und Plasma bestrahlter Ratten und Kaninchen.

Die Anwesenheit saurer und alkalischer Desoxyribonuklease im Medium von Knochenmarkkulturen bewirkt eine Hemmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus, die konzentrationsabhängig ist (Tab. 2, Abb. 1). Nur bei den geringen Konzentrationen von 0,1 und 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Kulturmedium war die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme erhöht. Das Wirkungsoptimum war mit einem  $\text{pH}$ -Wert von 7,4 und einer  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentration von 1,5 mM im Kulturmedium jedoch nur für die Pankreasdesoxyribonuklease nahezu erreicht.

In der bestrahlten Rattenmilz ist 1 Stunde nach einer 800 R-Ganzkörperbestrahlung ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Milzdesoxyribonukleaseaktivität zu beobachten. 6 Stunden nach der Bestrahlung kann eine Steigerung auf  $120 \pm 3\%$  gegenüber den Kontrollen (=100%) nachgewiesen werden.

In der Kaninchenmilz ist unmittelbar nach einer intraoperativen lokalen Milzbestrahlung mit 400 R eine Zunahme der Enzymaktivität auf 120% wahrzunehmen (Tab. 3, Abb. 2).

Im Plasma ganzkörperbestrahlter Ratten kann man erst 6 Stunden nach der Bestrahlung eine Aktivitätssteigerung auf  $129 \pm 6\%$  der Norm beobachten, während sich im Plasma von Kaninchen unmittelbar nach der lokalen Milzbestrahlung keine Veränderung zeigt.

Die alkalische Desoxyribonuklease konnte in Rattenmilz und -plasma nicht nachgewiesen werden. Die Ursache ist wohl in den für die alkalische Desoxyribonuklease beschriebenen Gewebsinhibitoren zu suchen (64 - 66).

## II) Der $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark bestrahlter Ratten.

- a) Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden.

Wird das Knochenmark ganzkörperbestrahlter Ratten in verschiedenen Zeitabständen nach einer Bestrahlung entnommen, so findet man in der Gewebekultur bei einer 15-stündigen Inkubationszeit der Ansätze  $^{32}\text{P}$ -Einbauraten, die von der Norm abweichen (Tab. 4). Setzt man die spezifische  $^{32}\text{P}$ -Aktivität von 1 mg aufgearbeiteten, jeweils zugehörigem Kontrollknochenmark zu 100%, so zeigt das 1 Stunde nach der Bestrahlung entnommene Mark eine Verminderung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus auf etwa 60% der Norm, um allmählich bis zu 4 Stunden nach der Bestrahlung wieder zu Normalwerten anzusteigen. Nach 5 und 6 Stunden entnommenes Mark zeigt eine Erhöhung der Einbaurate auf 120 - 130%, allerdings mit einer Streuung bis zu  $\pm 25\%$  (Abb. 3).

- b) Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, nachdem ihre Milz 24 Stunden vor der Bestrahlung am Hilus unterbunden worden war.

Gegenüber den milznormalen ganzkörperbestrahlten Ratten kann man hier eine Hemmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus auf 60% erst 2 Stunden nach der Bestrahlung beobachten (Tab. 5). Auffallend ist der nahezu parallele Verlauf der beiden Kurven mit ihrem um 1 Stunde verschobenen Minimum des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus (Abb. 3).

|                                 | Menge/ml<br>Medium<br>in $\mu\text{g}$ | Versuch Nr.      |     |     |     |    | Mittelwert<br>und Streuung<br>in % |
|---------------------------------|----------------------------------------|------------------|-----|-----|-----|----|------------------------------------|
|                                 |                                        | 1                | 2   | 3   | 4   | 5  |                                    |
| Pankreasdesoxy-<br>ribonuclease | 0,1                                    | 95               | 103 | 139 | 122 | —  | $115 \pm 15$                       |
|                                 | 1,0                                    | 100              | 124 | 146 | —   | —  | $123 \pm 19$                       |
|                                 | 5,0                                    | aus 22 Versuchen |     |     |     |    | $80 \pm 15$                        |
|                                 | 8,0                                    | 82               | 74  | 55  | 68  | 63 | $68 \pm 9$                         |
|                                 | 20,0                                   | 61               | 65  | 55  | —   | —  | $60 \pm 4$                         |
| Milzdesoxyribo-<br>nuclease     | 5,0                                    | 87               | 109 | 103 | —   | —  | $100 \pm 9$                        |
|                                 | 12,0                                   | aus 9 Versuchen  |     |     |     |    | $77 \pm 10$                        |
|                                 | 20,0                                   | 59               | 66  | 77  | 48  | —  | $62 \pm 10$                        |
|                                 | 50,0                                   | 47               | 54  | 38  | 56  | —  | $49 \pm 7$                         |

Tab. 2:  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmark normaler Ratten nach Zusatz von Milz- oder Pankreasdesoxyribonuklease zum Kulturmedium in verschiedenen Mengen. Weitere Angaben siehe Tab. 1. Kontrollwerte =  $100 \pm 8\%$ .

|           |        | Entnahme<br>nach<br>Bestrahlungs-<br>ende in Stunden | Versuch Nr. |     |     |     |     | Mittelwert<br>und Streuung<br>in % | Kontrolle<br>werte<br>in % |
|-----------|--------|------------------------------------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|----------------------------|
|           |        |                                                      | 1           | 2   | 3   | 4   | 5   |                                    |                            |
| Ratte     | Plasma | 1                                                    | 100         | 102 | 97  | 108 | —   | $102 \pm 4$                        | $100 \pm 14$               |
|           |        | 6                                                    | 121         | 134 | 133 | —   | —   | $129 \pm 6$                        | (n = 4)                    |
|           | Milz   | 1                                                    | 113         | 97  | 100 | 117 | 108 | $107 \pm 8$                        | $100 \pm 11$               |
|           |        | 6                                                    | 117         | 117 | 125 | 121 | —   | $120 \pm 3$                        | (n = 7)                    |
| Kaninchen | Plasma | unmittelbar                                          | 97          | 95  | —   | —   | —   | 96                                 | $100 \pm 18$<br>(n = 4)    |
|           | Milz   | unmittelbar                                          | 122         | 119 | —   | —   | —   | 120                                | $100 \pm 11$<br>(n = 4)    |

Tab. 3: Aktivitätszunahme von saurer Desoxyribonuklease in Milz und Plasma ganzkörperbestrahlter Ratten (800 R) und lokal milzbestrahlter Kaninchen (400 R). Als Maß dient die Zunahme der säurelöslichen Nukleotide nach 1-stündiger Inkubation mit DNS bei  $37^\circ$ . Kontrollwerte mit unbestrahlter Milz und Plasma = 100%. n = Anzahl der Kontrollversuche.

| Versuch<br>Nr.       | Zeitpunkt<br>1 Std. | der Entnahme<br>2 Std. | des Knochenmarks<br>3 Std. | nach Bestrahlung<br>4 Std. | 5 Std.      | 6 Std.       |
|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|--------------|
| 1                    | 57%                 | 71%                    | 79%                        | 139%                       | 118%        | 90%          |
| 2                    | 62%                 | 91%                    | 86%                        | 85%                        | 121%        | 116%         |
| 3                    | 47%                 | 86%                    | 77%                        | 89%                        | 137%        | 152%         |
| 4                    | 65%                 | 93%                    | 91%                        | 84%                        | 135%        | 97%          |
| 5                    | 69%                 | 92%                    | 81%                        | 88%                        | 114%        | 144%         |
| Mittel-<br>wert in % | 60 $\pm$ 8          | 87 $\pm$ 8             | 83 $\pm$ 5                 | 97 $\pm$ 21                | 125 $\pm$ 9 | 119 $\pm$ 25 |

Tab. 4:  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmark ganzkörperbestrahlter Ratten. Entnahme des Knochenmarks zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung. Weitere Angaben siehe Tab. 1. Kontrollwerte = 100  $\pm$  7%.

| Versuch<br>Nr.       | Zeitpunkt<br>1 Std. | der Entnahme<br>2 Std. | des Knochenmarks<br>3 Std. | nach Bestrahlung<br>4 Std. | 5 Std.       | 6 Std.       |
|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|
| 1                    | 94%                 | 54%                    | 96%                        | 117%                       | 139%         | 94%          |
| 2                    | 87%                 | 67%                    | 78%                        | 88%                        | 128%         | 136%         |
| 3                    | 77%                 | 55%                    | 81%                        | 90%                        | 142%         | 141%         |
| 4                    | 118%                | 49%                    | 102%                       | 120%                       | 110%         | 144%         |
| 5                    | 132%                | 66%                    | 111%                       | 98%                        | 145%         | 77%          |
| Mittel-<br>wert in % | 102 $\pm$ 20        | 58 $\pm$ 7             | 94 $\pm$ 12                | 103 $\pm$ 13               | 133 $\pm$ 13 | 118 $\pm$ 27 |

Tab. 5:  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark ganzkörperbestrahlter Ratten mit Milzunterbindung. Weitere Angaben siehe Tab. 1. Kontrollwerte = 100  $\pm$  7%.

- c) Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, nachdem ihre Milz 24 Stunden vor der Bestrahlung am Hilus unterbunden und zusätzlich noch in einem Beutel aus Polyäthylen-folie eingebunden worden war.

Bei dieser Versuchsanordnung wurde eine deutliche Hemmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in das Knochenmark vermißt; es kommt lediglich

nach 3 Stunden zu einer leichten Hemmung der  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme. Nach 4 Stunden ist sie schon auf 130 - 140% der Kontrollwerte gestiegen und 6 Stunden nach Bestrahlungsende zur Norm zurückgekehrt (Tab. 6).

Kontrollversuche mit unbestrahlten, operierten Tieren ergaben außer einer größeren Streuung, keine Veränderungen im  $^{32}\text{P}$ -Einbau gegenüber Normaltieren. Einige Ratten zeigten 24 Stunden nach der Operation entzündliche Zeichen in der Bauchhöhle mit jauchigem Geruch und Ascites. Die Werte dieser Tiere sind in der Tabelle nicht berücksichtigt.

- d) Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, und deren operativ freigelegte Milz während der Bestrahlung mit Blei abgeschirmt wurde.

Die Röntgenbestrahlung bei abgedeckter Milz bewirkt am Knochenmark, 1 Stunde nach der Bestrahlung entnommen, eine Hemmung der  $^{32}\text{P}$ -Einbaurrate auf 70% der Kontrollwerte. Bereits 2 Stunden nach der Bestrahlung sind die Werte auf etwa 110% erhöht, und bleiben es bis zu 6 Stunden nach der Bestrahlung. Kontrollversuche mit operierten, scheinbestrahlten Ratten ergaben keine Veränderungen (Tab. 7).

### III) Untersuchungen über die Rolle von Milzfaktoren für den $^{32}\text{P}$ -Einbau in Knochenmark- und Milzgewebe von Ratten.

- a) Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, deren Milz mit 800 R lokal bestrahlt wurde.

Eine selektive Bestrahlung der Milz ruft am Knochenmark schon 1 Stunde nach der Bestrahlung eine Erhöhung der  $^{32}\text{P}$ -Einbaurrate auf durchschnittlich 130% der Norm hervor. 5 Stunden danach sind die Werte wieder auf das Niveau der Kontrollwerte zurückgekehrt (Abb. 4, Tab. 8).

Wie bei allen Versuchen, bei denen ein operativer Eingriff notwendig war, ist auch hier die Streuung um den Mittelwert um 5 - 10% größer als bei einer Ganzkörperbestrahlung normaler Tiere.

| Versuch<br>Nr.       | Zeitpunkt<br>1 Std. | der Entnahme<br>2 Std. | des Knochenmarks<br>3 Std. | nach Bestrahlung<br>4 Std. | 5 Std.       | 6 Std.       |
|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|
| 1                    | 114%                | 84%                    | 72%                        | 147%                       | 144%         | 96%          |
| 2                    | 114%                | 101%                   | 73%                        | 154%                       | 90%          | 103%         |
| 3                    | 118%                | 96%                    | 69%                        | 112%                       | 113%         | 110%         |
| 4                    | 96%                 | 103%                   | 87%                        | 142%                       | 102%         | 97%          |
| 5                    | 91%                 | 90%                    | 118%                       | 117%                       | 133%         | 125%         |
| Mittel-<br>wert in % | 106 $\pm$ 11        | 95 $\pm$ 7             | 84 $\pm$ 18                | 134 $\pm$ 17               | 118 $\pm$ 20 | 106 $\pm$ 11 |

Tab. 6:  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark ganzkörperbestrahlter Ratten mit Milzunterbindung. Milz in einen Polyäthylenbeutel eingeschlossen. Weitere Angaben siehe Tab. 1. Kontrollwerte = 100  $\pm$  7%.

| Versuch<br>Nr.       | Zeitpunkt<br>1 Std. | der Entnahme<br>2 Std. | des Knochenmarks<br>3 Std. | nach Bestrahlung<br>4 Std. | 5 Std.       | 6 Std.       |
|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|
| 1                    | 74%                 | 124%                   | 121%                       | 147%                       | 140%         | 103%         |
| 2                    | 60%                 | 119%                   | 119%                       | 133%                       | 87%          | 145%         |
| 3                    | 81%                 | 99%                    | 102%                       | 102%                       | 125%         | 107%         |
| 4                    | 71%                 | 104%                   | 89%                        | 120%                       | 88%          | 91%          |
| 5                    | 72%                 | 102%                   | 109%                       | 133%                       | 119%         | 117%         |
| Mittel-<br>wert in % | 72 $\pm$ 7          | 109 $\pm$ 10           | 108 $\pm$ 12               | 127 $\pm$ 15               | 111 $\pm$ 22 | 112 $\pm$ 18 |

Tab. 7:  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von Ratten, deren Milz während der Bestrahlung bleigeschützt war. Weitere Angaben siehe Tab. 1. Kontrollwerte = 100  $\pm$  7%.

| Versuch<br>Nr.       | Zeitpunkt<br>1 Std. | der Entnahme<br>2 Std. | des Knochenmarks<br>3 Std. | nach Bestrahlung<br>4 Std. | 5 Std.       | 6 Std.       |
|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|
| 1                    | 120%                | 91%                    | 116%                       | 115%                       | 99%          | 93%          |
| 2                    | 113%                | 112%                   | 130%                       | 73%                        | 89%          | 138%         |
| 3                    | 138%                | 125%                   | 85%                        | 113%                       | 94%          | 91%          |
| 4                    | 125%                | 156%                   | 121%                       | 164%                       | 123%         | 102%         |
| 5                    | 150%                | 120%                   | 100%                       | 101%                       | 103%         | 97%          |
| Mittel-<br>wert in % | 131 $\pm$ 13        | 121 $\pm$ 21           | 110 $\pm$ 16               | 113 $\pm$ 29               | 102 $\pm$ 11 | 100 $\pm$ 18 |

Tab. 8:  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark lokal milzbestrahlter Ratten. Weitere Angaben siehe Tab. 1. Kontrollwerte = 100  $\pm$  7%.

- b) Die Wirkung von Plasma ganzkörperbestrahlter Ratten auf den  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark und das Milzgewebe nicht bestrahlter Ratten.

Das Plasma von Ratten, die mit 800 R ganzkörperbestrahlt wurden, hat einen fördernden Einfluß auf die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme in normales, nicht bestrahltes Knochenmark. 1 Stunde nach der Bestrahlung ist dieser Effekt am deutlichsten nachzuweisen, fehlt aber bei splenektomierten Tieren (67,68). Dasselbe Plasma bewirkt an Milzgewebe in vitro eine Hemmung der  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme auf  $87 \pm 8\%$  gegenüber den Kontrollen (Tab. 9).

- c) Die Wirkung von Plasma von lokal milzbestrahlten Ratten auf die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von Knochenmark nicht bestrahlter Ratten.

Plasma von nur milzbestrahlten Ratten (800 R), das 1 Stunde nach der Bestrahlung gewonnen wird, hat in vitro einen deutlich fördernden Einfluß auf den  $^{32}\text{P}$ -Einbau in normales Rattenknochenmark: er liegt mit etwa 130% höher als bei dem Plasma von ganzkörperbestrahlten Ratten (Tab. 9).

- d) Die Wirkung einer gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen auf die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von normalem Knochenmark-, Milz- und Lebergewebe von Ratten in vitro.

50  $\mu\text{g}$  der in Ölsäure injizierten Lipoidfraktion, dem Kulturmedium im 1, bzw. 2 Stunden nach der Injektion gewonnenen Plasma zugegeben, bewirkt ebenfalls am Knochenmark eine Steigerung, an der Milz aber eine Hemmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus, während Lebergewebe unbeeinflusst bleibt. Eine Wirkung, die nur auf Ölsäure zurückzuführen wäre, wurde durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen (Tab. 9).

|                                        | Behandlung des<br>Plasmaspender<br>tieres | Injektion von<br>50 µg Lipoidfraktion<br>in 0,05 ml Ölsäure |                                | 0,05 ml<br>Ölsäure            | 800 R<br>Ganzkörper-<br>bestrahlung | 300 R lokale<br>Milz-<br>bestrahlung | Normal-<br>plasma    |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
|                                        |                                           | 1 Stunde<br>nach<br>Injektion                               | 2 Stunden<br>nach<br>Injektion | 1 Stunde<br>nach<br>Injektion | 1 Stunde<br>nach<br>Bestrahlung     | 1 Stunde<br>nach<br>Bestrahlung      |                      |
| <sup>32</sup> P-Einbau<br>(Mittelwert) | Knochenmark                               | 121 ± 16<br>(n = 13)                                        | 109 ± 11<br>(n = 12)           | 91 ± 14<br>(n = 15)           | 111 ± 5<br>(n = 7)                  | 129 ± 19<br>(n = 11)                 | 100 ± 7<br>(n = 28)  |
|                                        | Milz                                      | 66 ± 16<br>(n = 12)                                         | —                              | 99 ± 18<br>(n = 16)           | 87 ± 8<br>(n = 9)                   | —                                    | 100 ± 11<br>(n = 16) |
|                                        | Leber                                     | 96 ± 15<br>(n = 10)                                         | —                              | —                             | —                                   | —                                    | 100 ± 2<br>(n = 5)   |

Tab. 9: <sup>32</sup>P-Einbau in Knochenmark-, Milz- und Leberge-  
webe normaler Ratten. Das Kulturmedium bestand  
zu 25% aus Plasma von Ratten nach einer Be-  
strahlung oder nach Injektion einer gereinig-  
ten Lipoidfraktion aus Rindermilzen (in Ölsäure).  
Weitere Angaben siehe Tab. 1. n = Anzahl der  
Versuche.

#### IV) Die Wirkung einer gereinigten Lipoidfraktion aus Rinder- milzen auf die Absterberate ganzkörperbestrahlter Ratten und Mäuse.

a) Vergleich der Absterberate ganzkörperbestrahlter Mäuse  
mit der von Mäusen, die nach der Bestrahlung Injektio-  
nen von physiologischer Kochsalzlösung, eines Gemisches  
von Kochsalzlösung und Äthanol oder von Kochsalzlösung,  
Äthanol und der Lipoidfraktion erhalten haben.

α) Die Absterbekurve über 30 Tage von Mäusen, die jeweils un-  
mittelbar nach der Bestrahlung und an den darauffolgenden 10  
Tagen je eine Injektion von 3 µg der gereinigten Lipoidfraktion  
oder des Kochsalzlösung-Äthanolgemisches erhielten und von Mäu-  
sen, die erst 24 Stunden nach der Bestrahlung und an 10 weite-  
ren Tagen dieselben Injektionen erhielten, lassen in keinem  
Falle einen signifikanten Unterschied erkennen (69). Aus Grün-

den der Übersichtlichkeit sind deshalb in den Abbildungen die Überlebenskurven der Tiere, die die erste Injektion erst 24 Stunden nach der Bestrahlung erhielten, weggelassen.

β) Die 10-malige, tägliche Injektion von 3  $\mu$ g der gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen besitzt gegenüber den Kontrolltieren eine deutliche Wirkung. Sie erhöht die Absterberate gegenüber ganzkörperbestrahlten Mäusen vom 8. bis zum 14. Tag nach der Bestrahlung statistisch signifikant. Es ist offensichtlich entscheidend, daß die erste Injektion unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgt (Abb. 5).

γ) Dem Alkohol selbst muß ebenfalls eine Wirkung zugeschrieben werden, denn dieselbe Injektionsfolge mit dem Gemisch aus Kochsalzlösung und Äthanol allein hat gegenüber den nur bestrahlten Kontrolltieren eine Verringerung der Überlebensrate zur Folge, statistisch signifikant zwischen dem 8. und 14. Tag nach der Bestrahlung. Sie verbessert jedoch die Überlebensrate gegenüber den mit der Lipoidfraktion gespritzten Mäusen zwischen dem 8. und 12. Tag ebenfalls signifikant (Abb. 5).

δ) Eine einmalige Injektion physiologischer Kochsalzlösung von 1 ml unmittelbar, 1 ml und 3 ml 24 Stunden nach einer Bestrahlung, erhöht die Überlebensrate gegenüber nur bestrahlten Mäusen vom 11. bis zum 30. Tag nach der Bestrahlung signifikant. Eine Injektion von 3 ml unmittelbar nach der Bestrahlung zeigt keine Wirkung (Abb. 6).

Bei einem Vergleich der Absterbekurven der Tiere nach einer einmaligen Injektion von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung unmittelbar nach der Bestrahlung, mit der der Tiere nach 10 Injektionen von 1 ml des NaCl-Lsg.-Äthanolgemisches, ergibt sich ein vom 8. Tag nach der Bestrahlung an größer, statistisch gesicherter Unterschied (Abb. 7). Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß durch die 10-malige intraperitoneale Injektion die Infektionsgefahr erhöht ist.

ε) Die 10-malige Injektion von je 30 µg des in Cyclohexan löslichen, durch Rotationsverdampfung gewonnenen Rückstandes aus Rindermilzhomogenat (siehe Schema der Aufarbeitung!), ebenfalls in 1 ml NaCl-Lsg.-Äthanolgemisch appliziert, ergibt gegenüber den nur mit Kochsalzlsg.-Äthanol gespritzten Tieren keinen Unterschied. Die auf das Äthanol zurückzuführende Verschlechterung der Überlebensrate bleibt erhalten (Abb. 8).

b) Vergleich der Absterberate ganzkörperbestrahlter, normaler Ratten mit splenektomierten Ratten nach Injektion einer gereinigten Lipoidfraktion aus Rindermilzen.

α) Die Injektion von 1 ml des Kochsalzlsg.-Äthanolgemisches unmittelbar und am 2. Tag, oder 24 Stunden und am 3. Tag nach der Bestrahlung ergibt keinen Unterschied zu den nur bestrahlten Kontrolltieren.

β) Für die Wirkung des Milzfaktors (10 µg/Injektion) ist es offenbar auch bei den Ratten entscheidend, daß die erste Injektion unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgt. Hier ist ein statistisch signifikanter Unterschied vom 13. bis zum 30. Tag nach der Bestrahlung zu beobachten (Abb. 9).

γ) Die Überlebensrate ganzkörperbestrahlter splenektomierter Ratten wurde durch Injektionen von je 10 µg der gereinigten Lipoidfraktion, unmittelbar und am 3. Tag nach der Bestrahlung, nicht beeinflusst (Abb. 10).

### Besprechung

Die Methode der Gewebezucht von Explantaten aus einzelnen Organen ist geeignet, zur Klärung bestimmter Funktionen im Organismus beizutragen. Denn so ist es möglich, die Regulationsmechanismen des Gesamtorganismus zu umgehen, und dessen Einwirkungen auf ein bestehendes Gleichgewicht auszuschalten. Die Aufnahme des in dieser Arbeit verwendeten  $^{32}\text{P}$  als Orthophosphat durch Zellen kann als Maß für die Mitoserate proliferierender Gewebe dienen (70 - 72): z.B. steigt der Phosphatgehalt während der Wachstumsphase des Ehrlich'schen Mäuseascitescarcinoms parallel mit dem Gewicht des Tumors (73); bei Earle's L-Zellen nimmt der Gehalt an DNS- $^{32}\text{P}$  proportional dem Anstieg der Zellzahl zu (74). Bevorzugt wird das Phosphat im Kern angereichert (72,75) und hier vornehmlich in die Nukleinsäuren eingebaut. Stark proliferierendes Gewebe wie das Knochenmark zeigt folglich eine hohe Einbaurate in die Nukleinsäuren und deren Vorstufen (71).

Normales Knochenmark zeigt in einer Gewebekultur während einer 20-stündigen Inkubationsdauer einen linearen Anstieg des  $^{32}\text{P}$ -Gehaltes, das Knochenmark bestrahlter Ratten dagegen nur während der ersten 8 - 10 Stunden einen etwa gleich großen Anstieg, bei längerer Inkubationsdauer aber eine deutliche Verminderung des  $^{32}\text{P}$ -Gehaltes. Dieser ist vom Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach der Bestrahlung abhängig (67). Auch das Knochenmark von Ratten, die an einer Myelose erkrankt sind, zeigt einen um  $43 \pm 10\%$  verminderten  $^{32}\text{P}$ -Einbau (59). Dabei nehmen besonders die unreifen Erythroblasten und die Promyelozyten, in geringerem Maße auch die Myeloblasten und Myelozyten  $^{32}\text{P}$  auf und reichern es im Kern an (76). Eine Störung der Mitoserate des Knochenmarks durch die  $\beta$ -Strahlen des  $^{32}\text{P}$  tritt erst bei Konzentrationen über  $50 \mu\text{C}/\text{ml}$  Medium auf (77). Versuche, bei denen aus der Einbaurate des  $^{32}\text{P}$  eines Gewebes auf dessen Proliferationsaktivität geschlossen wird, müssen unter gleichen Bedingungen vorgenommen werden. Das Ergebnis

Ia) zeigt u.a., daß bei vergleichenden Untersuchungen neben der Erbgleichheit des Tiermaterials auch auf eine konstante Ernährung mit einem bestimmten Futter zu achten ist. Der gefundene Unterschied in der  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme des Knochenmarks bei Fütterung der Inzuchtratten mit dem Futter "Altromin M" und "Altromin R" beträgt nahezu 30%. Auf Grund der Futteranalyse kann man annehmen, daß die von Geburt an mit "Altromin R" gefütterten Ratten gegenüber den mit "Altromin M" gefütterten chronisch unterernährt sind. Es besteht demnach ein Einfluß des Ernährungszustandes auf die Blutbildung. Aus Versuchen über das Erythropoetin ist bekannt, daß durch mehrtägiges Hungern auch die Erythropoese gedrosselt und damit die Ansprechbarkeit des Knochenmarks gegenüber erythropoetischen Reizen gesteigert wird (78,79).

Die hemmende Wirkung ionisierender Strahlen auf das Wachstum von Zellen ist vielfach beschrieben worden (80 - 82,49). Sie wird durch eine Beeinträchtigung sowohl der DNS-Synthese als auch der Mitose hervorgerufen. Man erkannte, daß diese beiden Vorgänge unabhängig voneinander verlaufen (83 - 87,49) und zu zwei besonders strahlensensiblen Phasen des Zellzyklus in Beziehung stehen. Für die DNS-Neubildung ist dies die sogenannte praesynthetische oder  $G_1$ -Phase, für die Mitose die sogenannte praemitotische oder  $G_2$ -Phase der Interphase, die der Vorbereitung zur Mitose dient (88).

Wird eine Zelle, die sich in der  $G_1$ -Phase befindet, bestrahlt, so wird die zur DNS-Verdopplung notwendige Neubildung der DNS-Polymerase je nach Strahlendosis verhindert oder verzögert (89 - 91); die einmal angelaufene DNS-Synthese wird jedoch von der Bestrahlung nicht mehr wesentlich beeinflußt (92). Da der Mitosemechanismus eine größere Strahlenempfindlichkeit besitzt als die DNS-Verdopplung, kommt es dann zur Ausbildung polyploider Kerne (85,87). Ebenso ist die DNS-Neubildung gegenüber einer Bestrahlung wesentlich empfindlicher als die Bildung von Vorstufen der DNS (88,93,94). Dagegen kann ein strahlenunempfindlicher Einbau von Vorstufen in die DNS eine

aktive DNS-Synthese vortäuschen. So bewirkt eine Tumorbestrahlung mit 9000 R bei Mäusen keine größere Hemmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in die DNS als mit 1000 R. Diese strahlenunempfindliche Aufnahme markierter Vorstufen in die DNS, die 40 - 50% des Einbaus bei unbestrahlten Tieren beträgt, geht anscheinend auf endständige Austauschvorgänge an der DNS zurück (80,95).

Die Hemmung der  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme durch Knochenmarkszellen ist bei den von mir angewendeten Strahlendosen auf eine verminderte Nukleinsäuresynthese der Zellen zurückzuführen (89,96 - 98). Darauf deutet auch die Hemmwirkung der beiden Desoxyribonukleasen auf die Knochenmarksproliferation in vitro hin. Am Bakteriendesoxyribonukleinsäure konnte gezeigt werden (82), daß die Pankreasdesoxyribonuklease sowohl die Präger-DNS wie auch die neugebildete DNS abbaut. Für eine normale DNS-Polymerasewirkung ist aber die Anwesenheit von Präger-DNS notwendige Voraussetzung. Es wird also durch die Desoxyribonuklease auch die weitere DNS-Neusynthese gestört.

Dagegen wurde beobachtet, daß geringe Mengen Desoxyribonuklease sich auf die DNS-Synthese fördernd auswirken können (99). Dieser Effekt ist auch in den vorliegenden Versuchen bei den Konzentrationen von 0,1 und 1,0  $\mu\text{g}$  Pankreasdesoxyribonuklease/ml Kulturmedium nachzuweisen. Die Ursache ist wohl darin zu suchen, daß Oligodesoxyribotide mit freier 3'-Hydroxygruppe, die bei Einwirken der Pankreasdesoxyribonuklease entstehen, als Präger wirksam sind. So vermag eine aus *E. coli* isolierte DNS-Phosphatase, welche in spezifischer Weise endständige 3'-Phosphate abspaltet, also zu denselben Endprodukten mit 3'-Hydroxygruppen führt wie die Pankreasdesoxyribonuklease, die Prägerwirkung der DNS um das 2 bis 10-fache zu steigern (100).

Weil in den hier beschriebenen Versuchen die  $^{32}\text{P}$ -haltigen Vorstufen der DNS nicht von der DNS selbst abgetrennt wurden, können die angegebenen Zahlen des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus nur als ein relatives Maß der DNS-Synthese angesehen werden. Auch ist keine Aussage über den Anteil einzelner Zellarten auf den Gesamteinbau möglich.

Die Bestrahlungsversuche belegen, daß Knochenmarkszellen nach einer in-vivo-Bestrahlung eine in vitro nachweisbare zyklische Veränderung ihres Phosphateinbaus besitzen: wird das Knochenmark 30 Minuten nach einer Bestrahlung mit 800 R entnommen, so ist die Hemmung des Phosphateinbaus in der Gewebekultur gering (67); die DNS-Synthese läuft offenbar in jenen Zellen normal ab, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits Polymerase gebildet haben. Liegt der Zeitpunkt der Entnahme des Knochenmarks dagegen 1 - 4 Stunden nach der Bestrahlung, so ist die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme vermindert, da sich jetzt die Zellen mit gestörter Polymerasebildung im Stadium der DNS-Synthese befinden. Etwa 5 - 6 Stunden nach der Bestrahlung ist aber dann wieder eine Zellgeneration herangereift, die sich zur Zeit der Bestrahlung hinsichtlich ihrer Zellteilung in der Ruhephase befand. Bei Rattenknochenmarkszellen ist die Dauer der DNS-Synthesephase mit etwa 7,5 Stunden ziemlich konstant, während die postmitotische-präsynthetische  $G_1$ -Phase großen Schwankungen unterworfen ist (101). Damit stimmt die Beobachtung gut überein, daß nach einer Bestrahlung mit 800 R und einer Gewebeentnahme bis zu 20 Minuten nach der Bestrahlung der Phosphateinbau in der Gewebekultur in den ersten 6 - 8 Stunden normal, d.h. linear verläuft, und dann erst gegenüber den Kontrollen mit nicht bestrahltem Mark zurückbleibt (67). Ferner ließ sich durch diese Versuche eine von vielen Autoren beobachtete Einwirkung der Milz auf das Knochenmark unter einer Bestrahlung bestätigen. Es wurden sowohl hemmende als auch fördernde Einflüsse beobachtet.

Eine Hemmung der Zellteilung, besonders des blutbildenden Gewebes mit seiner hohen Teilungsaktivität, durch stoffliche Faktoren aus der Milz, ist häufig beschrieben worden: Nach Milzentfernung kommt es z.B. zu einer ausgeprägten Leukozytose (68, 102 - 104), die erst im Laufe von Wochen allmählich zurückgeht. Implantiert man splenektomierten Ratten mit postoperativer Leukozytose ein kleines Stückchen Milzgewebe

in die Bauchhöhle, so kehren die Leukozytenwerte wieder auf Normalwerte zurück. Schon 10% der ursprünglichen Milz genügen, um diesen Effekt hervorzurufen (102). Entfernt man das implantierte Milzgewebe, dann kommt es wieder zu dem charakteristischen Leukozytenanstieg wie nach einer Splenektomie (105). Bei Parabioseratten kann man denselben Effekt beobachten (102). Füttert man Ratten mit frischen rohen Milzen, so entwickelt sich eine Leukopenie. Andere Organe oder gekochte Milzen sind ohne Wirkung (106).

Ein Extrakt aus Rinder- und Rattenmilzen gesunder Tiere enthält einen stofflichen Faktor, der bei Deciduazellen eine mitosehemmende Wirkung hat (107). Extrakte aus menschlichen Hyperspleniemilzen führen am überlebenden menschlichen Knochenmark zu einer Reifungshemmung der myeloischen Elemente (108). Unterbindet man die Vena lienalis des Kaninchens und schafft so einen Umgehungskreislauf um die Leber, dann findet man ein verschieden starkes Absinken der Konzentration sämtlicher im Knochenmark gebildeter Blutzellen. Die Deutung dieses Versuches, durch die Bildung des Umgehungskreislaufes ein Mehrangebot eines "Milzwirkstoffes" erreicht zu haben, ist allerdings umstritten (109 - 111), da die Anämie nach Unterbindung der Milzvene zum Teil hämolytischen Charakter hat.

Werden milznormale Tiere mit einer Dosis bestrahlt, die zur hämatologischen Form der Strahlenkrankheit führt, ist ebenfalls eine Hemmwirkung der Milz auf die Blutbildung zu beobachten. Vergleicht man nämlich die Absterberate milznormaler mit der splenektomierter Tiere nach Ganzkörperbestrahlung, so überleben deutlich mehr von den splenektomierten Tieren (6 - 8, 35 - 37, 41). Damit stimmt auch die Beobachtung des frühzeitigen Wiederbeginns der Mitoseaktivität des blutbildenden Gewebes nach Ganzkörperbestrahlung splenektomierter Ratten und Mäuse überein (5, 31). Eine Ganzkörperbestrahlung mit 800 R ruft am Knochenmark splenektomierter Ratten eine deutlich geringere Hemmung des Phosphateinbaus hervor, als bei milznormalen Ratten. Die Hemmung entspricht etwa der Reaktion eines milznormalen Tieres nach einer Strahlendosis von 150 R (68).

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Versuche machen ebenfalls einen humoralen Faktor der Milz, der sich auf das Knochenmark hemmend auswirkt, wahrscheinlich. Verbleibt nämlich die Milz im Körper und werden nur die zu- und abführenden Blutgefäße unterbunden, so kann man eine Hemmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in das Knochenmark beobachten, die der bei milznormalen Ratten wieder gleichkommt, aber mit einer Verschiebung des Hemmungsmaximum von 1 auf 2 Stunden nach der Bestrahlung. Erst die weitgehende Isolierung der Milz durch ihren Einschluß in einen Plastikbeutel, die einer Splenektomie praktisch gleichkommt, führte zu Ergebnissen, die auch bei splenektomierten Ratten beobachtet wurden. Die zeitliche Verschiebung des Hemmungsmaximum um 1 Stunde und die geringere Hemmung der Phosphataufnahme nach Ausschalten der Milz, deuten darauf hin, daß ein durch die Bestrahlung freigesetzter humoraler Faktor der Milz sowohl über den Blut- oder Lymphweg als auch über eine Resorption durch das Peritoneum auf die Knochenmarksproliferation sich zusätzlich hemmend auswirkt. Derartige in vivo induzierte Funktionszustände werden dann in der Gewebekultur beibehalten (112). Die Hemmung des Phosphateinbaus von 70 - 80% in das Knochenmark milzloser Ratten dürfte die Folge der direkten Strahlenwirkung auf die Zelle sein.

Die normale strahlengeschützte Milz besitzt aber eine die Blutbildung fördernde Wirkung: Mäuse, deren Milz während der Bestrahlung abgeschirmt war, überleben deutlich länger (5,113). Milztransplantate oder Injektion von Milzzellsuspensionen bei Mäusen und Kaninchen nach einer Bestrahlung verbessern die Überlebensrate erheblich (5,11). Die ursprüngliche Annahme, daß diese knochenmarksfördernde Wirkung zellgebunden sei, wurde durch zahlreiche Versuche widerlegt (17 - 19,23 - 26,28,29,114).

Für eine die Knochenmarksproliferation aktivierende Wirkung der Milz sprechen auch folgende 4 Ergebnisse aus den hier beschriebenen Versuchen:

1) Wird während einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R die Rattenmilz mit Blei abgeschirmt, ist bei der Bestimmung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in das Knochenmark ein deutlich geringerer Hemmeffekt als bei ganzkörperbestrahlten Tieren nachzuweisen. Der Phosphateinbau ist schon nach 2 Stunden bis 6 Stunden nach der Bestrahlung deutlich über die Norm gesteigert.

2) Es läßt sich mit dem Plasma ganzkörperbestrahlter milznormaler und lokal milzbestrahlter Ratten eine Steigerung des Phosphateinbaus in normales Knochenmarkgewebe *in vitro* erzielen. Diese Wirkung fehlt im Plasma splenektomierter Ratten (68).

3) Das Knochenmark lokal milzbestrahlter Ratten zeigt schon 1 Stunde nach Bestrahlung der Milz einen auf 130% der Norm gesteigerten Phosphateinbau, der im Verlauf von 6 Stunden zu Kontrollwerten zurückkehrt.

4) Auch das Plasma dieser lokal milzbestrahlten Ratten bewirkt, 1 Stunde nach der Bestrahlung entnommen, am normalen Rattenknochenmark eine  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von 130%.

Der Ursprungsort des den Phosphateinbau steigernden Prinzips ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Milz; denn der Faktor ist im Plasma ganzkörperbestrahlter und lokal milzbestrahlter Ratten nachzuweisen, fehlt aber bei bestrahlten splenektomierten Tieren. Er löst *in vivo* und *in vitro* eine erhöhte  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme in das bestrahlte Knochenmark aus.

Die Wirkung der lokal bestrahlten und der bleigeschützten Milz ist wahrscheinlich auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Während sich die knochenmarksfördernde Wirkung des Plasmas bei lokaler Milzbestrahlung auf die Anwesenheit der bestrahlten Milz zurückführen läßt, ist sie bei der strahlengeschützten Milz eher in dem Wegfall der zusätzlichen Belastung, die die bestrahlte Milz für den strahlengeschädigten Organismus bildet, zu suchen.

Eine ähnliche Beobachtung mit Plasmafaktoren nach Bestrahlung ist auch bei der Lymphopoese gemacht worden. Wird eine Leistenbeuge einer Ratte während einer Ganzkörperbestrahlung ab-

geschirmt, so wird die Mitoserate in den entsprechenden Lymphknoten beider Seiten, wenn auch nicht gleich stark, herabgesetzt. Die Injektion des Serums von Ratten nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 550 R erhöht die Mitoserate in den Lymphknoten nicht bestrahlter Ratten (115). Bei Kaninchen ist 3 Stunden nach einer lokalen Milzbestrahlung mit 300 R eine Mitosehemmung der Erythropoese im Knochenmark nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier mitgeteilten Versuche bewirkt aber das Plasma dieser milzbestrahlten Tiere bei unbestrahlten Empfängertieren ebenfalls eine Erythropoesehemmung gleichen Ausmaßes. Blut, daß bis 2 Stunden nach der Bestrahlung entnommen wird, enthält diesen Hemmfaktor nicht (116,117).

Bei den Bemühungen, einen Plasmafaktor mit Hemmwirkung auf das Knochenmark zu finden, wurde die Milzdesoxyribonuklease nach einer Bestrahlung untersucht. Ein Anstieg der sauren Desoxyribonuklease konnte nach Ganzkörperbestrahlung von Tieren in den blutbildenden Organen (118 - 122), sowie im Plasma (123) und im Urin (124 - 127) beobachtet werden. Die meisten dieser Untersuchungen sind viele Stunden, meist Tage nach der Bestrahlung vorgenommen worden.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen an der Rattenmilz stimmen gut mit den Angaben der Literatur überein (128,129): Die Milzdesoxyribonuklease tritt in Milz und Plasma bestrahlter Ratten in höherer Konzentration erst etwa 6 Stunden nach einer Bestrahlung auf; diese nimmt noch nach Tagen zu. Der <sup>32</sup>P-Einbau in das Knochenmark bleibt aber von 5 Stunden bis zu 4 Tagen nach der Bestrahlung auf etwa 120% erhöht (67). Die Milzdesoxyribonuklease kann deshalb nicht mit dem Hemmfaktor der Milz identisch sein. Die hohe Enzymaktivität in der Kaninchenmilz unmittelbar nach der Bestrahlung ist vielleicht mit dem in der normalen Milz schon hohem Desoxyribonukleasegehalt zu erklären; Er ist etwa doppelt so groß wie in der Rattenmilz (130).

Auffallend ist, daß durch die Bestrahlung von Milz und Thymus vor allem Fermente des Abbaustoffwechsels aktiviert werden, wie z.B. die Milzdesoxyribonuklease, die Adenosintriphosphatase, die 5-Nukleosid-Phosphorylase, die Phosphoprotein-Phosphatase, die alkalische Phosphatase und das gelatine-spaltende Kathepsin (131 - 133). Diesen Fermenten ist noch gemeinsam, daß sie funktionelle SH-Gruppen tragen, denen bei der Einwirkung ionisierender Strahlen ebenfalls Bedeutung zukommt. Die gefundene Hemmwirkung der beiden Desoxyribonukleasen auf die Proliferationsfähigkeit des Knochenmarks in vitro fügt sich gut in dieses Bild (134). Ihnen kommt wahrscheinlich eine Bedeutung beim Strahlenschaden zu: Während nämlich in den strahlenempfindlichen Geweben wie Milz, Knochenmark und Thymus nach Röntgenbestrahlung ein erheblicher Anstieg ihrer Aktivität, vor allem der Milzdesoxyribonuklease zu beobachten ist, fehlt dieser Anstieg bei relativ strahlenunempfindlichen Organen wie der normalen Leber und Niere, oder ist nur gering. In Knochenmarkszellen von Mäusen nimmt der Gehalt an saurer Desoxyribonuklease mit steigender Dosis zu. Auch im mit Blei abgeschirmten Knochenmark ist 24 Stunden nach einer Bestrahlung eine erhöhte Aktivität nachweisbar. Diese "Fernwirkung" hängt sowohl von der Menge des bestrahlten Gewebes - maximal Ganzkörperbestrahlung mit Abdeckung einer Extremität - als auch von der Strahlendosis ab (121, 122). Bei den in vivo durchgeführten Bestrahlungen sind die angewandten Dosen, die zu Kernschäden führen, wesentlich niedriger (135), als jene, die erforderlich sind, um in vitro depolymerisierend auf die DNS zu wirken (136). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß in strahlenempfindlichen Zellen die Veränderungen an der DNS auch auf enzymatische Wirkungen zurückzuführen sind (80).

Neben den Faktoren der Milz, die auf die Knochenmarksproliferation sowohl hemmend als auch fördernd wirken, konnten noch weitere spezifische Milzwirkungen beobachtet werden.

Aus zellelektrophoretischen Untersuchungen ist bekannt, daß eine gereinigte Lipoidfraktion aus Rindermilzen, deren biologische Eigenschaften nach bisherigen Beobachtungen mit einer gleichartig gewonnenen Fraktion von Menschen- oder Rattenmilzen übereinstimmen, in erster Linie auf das lymphatische System wirkt. Nach intravenöser Injektion dieser Lipoidfraktion zeigt sich, daß die Lymphozyten der Rattenlymphe aus dem Ductus thoracicus hinsichtlich ihres elektrischen Zellmembranmusters einer Veränderung unterliegen: etwa 30 - 40% von ihnen sind elektrophoretisch "schnell" wandernde Zellen. Entfernt man die Milz als den größten Teil des lymphatischen Systems, so sind fast keine dieser "schnell" wandernden Lymphozyten in der Lymphe mehr nachzuweisen. Das periphere Blut zeigt dieselben Veränderungen (60 - 62). Nach Ganzkörperbestrahlung sind sämtliche Lymphozyten des Ductus thoracicus elektrophoretisch "schnell" wandernde Zellen. Splenektomie der Ratten vor der Bestrahlung verhindert den Effekt (137). Eine ähnliche Wirkung besitzt auch eine aus Rattenhepatom - Asciteszellen gewonnene, hämatologisch aktive Substanz (138).

In den in-vitro-Versuchen bewirkt diese gereinigte Lipoidfraktion aus Milzen am normalen Knochenmark eine Erhöhung, am Milzgewebe eine Hemmung des Phosphateinbaus, Lebergewebe bleibt unbeeinflusst. Die gleiche Reaktion zeigen Milz und Knochenmark unter dem Einfluß von Plasma ganzkörperbestrahlter Ratten, das 1 Stunde nach Bestrahlung entnommen wurde (139).

Eine weitere Wirkung der Lipoidfraktion zeigt sich in der erhöhten Absterberate der damit injizierten ganzkörperbestrahlten Ratten und Mäuse. Sie ist allerdings nur dann statistisch signifikant, wenn eine Injektion der Fraktion unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgt. Parallele Untersuchungen am Bluthild von Ratten nach intravenöser Injektion des Milzfaktors ergaben einen Abfall der Lymphozytenwerte. Es hat den Anschein, daß durch die Injektion der Lipoidfraktion der etwa 3 Stunden nach einer Ganzkörperbestrahlung von 600 - 800 R

beobachtete Lymphozytensturz bei Ratten (140) noch potenziert und durch eine mehrmalige Injektion der Fraktion die Regeneration verzögert wird. Bei Mäusen blieb nach Injektion der 10-fachen Menge der noch ungereinigten Milzfraktion die Wirkung auf die Überlebensrate aus.

Als Nebenfund zeigte sich, daß eine Injektion von Äthanol bei Ratten und Kaninchen, als Lösungsmittel für die Lipoidfraktion, ebenfalls eine Verringerung der Lymphozyten im Differentialblutbild mit sich bringt (Abb. 11). So ist auch die Erhöhung der Absterberate der als Kontrolltiere dienenden Mäuse zu erklären, die jeweils 10 Injektionen eines Kochsalzlösung-Äthanolgemisches zu je 1 ml erhalten haben. Die Ratten erhielten nämlich, bezogen auf ihr durchschnittliches Körpergewicht von etwa 120 g an 2 Tagen nur je 0,5<sup>0</sup>/oo Alkohol, während den Mäusen mit durchschnittlich 20 g Körpergewicht an 10 Tagen je 2,5<sup>0</sup>/oo Äthanol injiziert worden war.

### Zusammenfassung

- 1) Die Methode der Gewebebezücht ist geeignet, mit Hilfe des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in die Zellen Aussagen über die Proliferationsfähigkeit von Geweben zu machen. Um Ergebnisse vergleichen zu können, ist eine konstante Ernährung der Spenderversuchstiere mit einem bestimmten Futter wesentlich.
- 2) Es konnte mit dieser Methode nach einer Bestrahlung mit 800 R sowohl eine die Proliferationsfähigkeit des Knochenmarks hemmende (A) als auch eine fördernde (B) Wirkung der Milz nachgewiesen werden.

#### A) Knochenmarkhemmung:

- a) Eine Ganzkörperbestrahlung splenektomierter Ratten verringert die Knochenmarkhemmung im Vergleich zu ganzkörperbestrahlten milznormalen Ratten um 25 - 30%. Die gleiche Wirkung erhält man mit Ratten, deren Milz vor der Bestrahlung in einen Polyäthylenbeutel eingeschlossen wurde.
- b) Bei ganzkörperbestrahlten milznormalen Ratten und solchen mit Milzunterbindung ist die Knochenmarkhemmung etwa gleich groß. Nur ist das Hemmungsmaximum, vermutlich wegen der erschwerten Resorption des Milzfaktors aus der Bauchhöhle, von einer auf zwei Stunden nach der Bestrahlung verschoben.

#### B) Knochenmarkförderung:

- a) Eine lokal bestrahlte Milz besitzt in vivo eine die Proliferation des normalen Knochenmarks fördernde Wirkung.
- b) Ebenso bewirkt das Plasma normaler ganzkörperbestrahlter oder lokal milzbestrahlter Ratten, 1 Stunde nach der Bestrahlung entnommen, in vitro eine Erhöhung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in normales Knochenmark und eine Hemmung des Phosphateinbaus in Milzgewebe.

- c) Das Knochenmark von Ratten, deren Milz während einer Bestrahlung mit Blei abgeschirmt wurde, zeigt 1 Stunde nach der Bestrahlung eine Hemmung der  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme wie das Knochenmark ganzkörperbestrahlter splenektomierter Ratten. Während bei den splenektomierten Ratten die Knochenmarkhemmung mehrere Stunden nach der Bestrahlung anhält, wird bei den milzgeschützten Ratten schon 2 Stunden nach der Bestrahlung der Ausgangswert wieder erreicht.
- 3) Eine weitere spezifische Milzwirkung wurde nach Injektion einer Lipoidfraktion aus Säugetiermilzen beobachtet:
- a) Das Plasma der Ratten, denen die Lipoidfraktion injiziert wurde, verursacht am normalen Knochenmark- und Milzgewebe in vitro dieselbe Wirkung wie das Plasma ganzkörperbestrahlter oder lokal milzbestrahlter Ratten: Am Knochenmark führt es zu einem erhöhten, an der Milz zu einem erniedrigten Phosphateinbau.
  - b) Nach einer Ganzkörperbestrahlung von Ratten treten im peripheren Blut und in der Lymphe des Ductus thoracicus zellelektrophoretisch "schnelle" Lymphozyten auf. Eine Injektion der Lipoidfraktion zeigt, wenn auch in geringerem Ausmaß, die gleiche Wirkung.
  - c) Die mehrmalige Injektion der Lipoidfraktion erhöht die Absterberate von ganzkörperbestrahlten Ratten und Mäusen signifikant. Dabei scheint es von Bedeutung zu sein, daß die erste Injektion unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgt.
- 4) Milz- und Pankreasdesoxyribonuklease hemmen in vitro konzentrationsabhängig den Phosphateinbau in normales Rattenknochenmark. Der Gehalt an Milzdesoxyribonuklease ist 6 Stunden nach einer Bestrahlung in Milz und Plasma von Ratten erhöht, ist aber mit dem Hemmfaktor des Knochenmarks nicht identisch.

Literatur

- 1) Heineke, H.: a) Münch. med. Wschr. 50, 2090 (1903)  
b) Münch. med. Wschr. 51, 785 (1904)  
c) Münch. med. Wschr. 60, 2657 (1913)
- 2) Heilmeyer, L.: Klin. Wschr. 33, 689 (1955)
- 3) Weinreich, J.: Med. Klinik 58, 81 (1963)
- 4) Ruhenstroth-Bauer, G.: Sem. Hemat. 2, 229 (1965)
- 5) Jacobson, L.O., Simmons, E.J., Marks, E.K. and Eldredge, H.J.: Science 113, 510 (1951)
- 6) Fridrich, R.: Strahlentherapie 116, 259 (1960)
- 7) Melching, H.J., Messerschmidt, O. und Streffer, Ch.: Strahlentherapie 114, 179 (1961)
- 8) Melching, H.J.: Acta Hepato-Splenol. 11, 218 (1964)
- 9) Melching, H.J. und Messerschmidt, O.: Med. Klinik 55, 1831 (1960)
- 10) Rodesch, J., Jandel, C., Chirpaz, B. und Mandel, P.: Experientia 11, 437 (1955)
- 11) Jacobson, L.O., Marks, E.K. and Gaston, E.O.: Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 91, 135 (1956)
- 12) Langendorff, H., Koch, R., Katsch, A. und Hagen, U.: Strahlentherapie 102, 298 (1957)
- 13) Fliedner, T.M.: Strahlentherapie 106, 212 (1958)
- 14) Floersheim, G.L.: Schweiz. med. Wschr. 92, 1331 (1962)
- 15) Cole, L.J. and Ellis, M.E.: Cancer Res. 14, 738 (1954)
- 16) Cole, L.J. and Ellis, M.E.: Amer. J. Physiol. 194, 16 (1958)
- 17) Ellinger, F.: Science 126, 1179 (1957)
- 18) Ellinger, F.: Amer. J. Roentgenol. 87, 547 (1962)
- 19) Ellinger, F. and Lindsley, B.F.: Arch. int. Pharmacodyn. 132, 310 (1961)
- 20) Tzun-hsien Chang: Med. Radiol., Mosk. 8, 48 (1963)
- 21) Allen, B.R., Wardwell, H.G. and Clay, M.: Radiat. Res. 3, 210 (1955)
- 22) Malinin, T.I., Perry, V.P., Kerby, C.C. and Dolan, M.F.: Blood 25, 693 (1965)
- 23) Thom, H.J.: Strahlentherapie 109, 47 (1959)
- 24) Thom, H.J.: Strahlentherapie 111, 26 (1960)
- 25) Cole, L.J., Fishler, M.C., Ellis, M.E. and Bond, V.P.: Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 80, 112 (1952)

- 26) Cole, L.J., Ellis, M.E., Fishler, M.C. and Bond, V.P.:  
Fed. Proc. 11, 26 (1952)
- 27) Cole, L.J., Fishler, M.C. and Bond, V.P.: Fed. Proc. 12, 27  
(1953)
- 28) Strike, T.A. and Ellinger, F.: Acta haemat., Basel 29, 96  
(1963)
- 29) Katz, S. and Ellinger, F.: Nature 197, 397 (1963)
- 30) Stodtmeister, R., Fliedner, T.H. und Thom, H.J.: Schweiz. med.  
Wschr. 90, 1186 (1960)
- 31) Bauer, R. und Hartweg, H.: Fortschr. Röntgenstr. 88, 31 (1958)
- 32) Bauer, R. und Hartweg, H.: Fortschr. Röntgenstr. 89, 740 (1958)
- 33) Bauer, R. und Hartweg, H.: Fortschr. Röntgenstr. 92, 572 (1960)
- 34) Bauer, R. und Hartweg, H.: Fortschr. Röntgenstr. 95, 682 (1961)
- 35) Ladner, H.A. und Schneider, J.: Naturwissenschaften 51, 266  
(1964)
- 36) Ladner, H.A., Gruenagel, H.H. und Schweikert, C.H.: Natur-  
wissenschaften 52, 62 (1965)
- 37) Melching, H.J. und Messerschmidt, O.: Naturwissenschaften  
47, 307 (1960)
- 38) Melching, H.J. und Messerschmidt, O. und Shibata, K.: Natur-  
wissenschaften 48, 576 (1961)
- 39) Melching, H.J., Messerschmidt, O., Streffer, Chr. und  
Shibata, K.: Strahlentherapie 116, 395 (1961)
- 40) De Franciscis, P. and Scancani, E.: Radiology 73, 424 (1959)
- 41) Fridrich, R.: Schweiz. med. Wschr. 93, 371 (1963)
- 42) Fleming, K.: Naturwissenschaften 49, 87 (1962)
- 43) Fleming, K.: Biophysik 1, 339 (1964)
- 44) Buchanan, K.D. and MacGregor, R.F.S.: Brit. J. exp. Path.  
45, 248 (1964)
- 45) Bauer, R. und Hartweg, H.: Fortschr. Röntgenstr. 96, 676  
(1962)
- 46) Bauer, H.: Ärztl. Forsch. 7, 377 (1962)
- 47) Choné, B.: Nuclear Med. 2, Suppl. 1, 425 (1963)
- 48) Scherer, E. und Vogell, W.: Strahlentherapie 106, 202 (1958)
- 49) Lajtha, L.G.: Progress Bioph. 11, 80 (1961)
- 50) Diethelm, L. und Lorenz, W.: Strahlentherapie 122, 222 (1963)
- 51) Sestan, N.: Nature 205, 615 (1965)
- 52) Maas, H. und Timm, M.: Strahlentherapie 123, 1 (1964)

- 53) Maas,H.: Strahlentherapie 112, 79 (1960)
- 54) Uyeki,E.M. and Salerno,P.R.: Blood 14, 1128 (1959)
- 55) Hagen,U.: Nature 187, 1123 (1960)
- 56) Hagen,U.: Strahlentherapie 117, 119 (1862)
- 57) Goutier,R., Goutier-Pirotte,M. and Raffi,A.: Int. J. Radiat. Biol. 8, 51 (1964)
- 58) Trowell,O.A.: Exp. Cell Res. 16, 118 (1959)
- 59) Ruhenstroth-Bauer,G. und Gostomzyk,J.G.: Z. Krebsforsch. 65, 108 (1962)
- 60) Gostomzyk,J.G., Feeser,C. und Ruhenstroth-Bauer,G.: Klin. Wschr. 42, 231 (1963)
- 61) Gostomzyk,J.G., Feeser,C. und Ruhenstroth-Bauer,G.: Z. Naturforsch. 19b, 769 (1964)
- 62) Gostomzyk,J.G., Huhle,C., Heidenreich,P. und Ruhenstroth-Bauer,G.: 10. europäischer Kongreß für Hämatologie, Straßburg (1965), im Druck
- 63) Koerner,J.F. and Sinsheimer,R.L.: J. biol. Chem. 228, 1039 (1957)
- 64) Feinstein,R.N. und Hagen,U.: Feder. Proc. 18, 225 (1959)
- 65) Feinstein,R.N.: J. biol. Chem. 235, 733 (1960)
- 66) Cunningham,L. and Laskowsky,M.: Biochim. biophys. Acta 11, 590 (1953)
- 67) Ruhenstroth-Bauer,G., Gostomzyk,J.G. und Arnold,R.: Strahlentherapie 122, 56 (1963)
- 68) Gostomzyk,J.G., Arnold,R. und Ruhenstroth-Bauer,G.: Naturwissenschaften 23, 704 (1963)
- 69) Koller,S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen; 3. Aufl., (D. Steinkopff/Darmstadt)
- 70) Osgood,E.E., Li,J.G., Tivey,H., Duerst,M.L. and Seaman,A.J.: Science 114, 95 (1951)
- 71) Smelie,R.M.S., Humphrey,G.F., Key,E.R.M. and Davidson,J.N.: Bioch. J. 60, 177 (1955)
- 72) Marshak,A.: J. gen. Physiol. 25, 275 (1941)
- 73) Wrba,H. und Seidler,E.: Z. Krebsforsch. 59, 693 (1954)
- 74) Healy,G.M., Siminovitch,L., Parker,R.C. and Graham,A.F.: Biochim. biophys. Acta 20, 425 (1956)
- 75) Schleich,A. und Wrba,H.: Z. Krebsforsch. 59, 543 (1958)
- 76) Boll,I. und Mehl,H.G.: Klin. Wschr. 34, 157 (1956)
- 77) Boll,I.: Haemat. lat., Milano 2, 115 (1959)
- 78) Fruhman,G.J. and Gordon,A.S.: Anat. Rec. 122, 492 (1955)

- 79) Fried, W., Plzak, L., Jacobson, L.O. and Goldwasser, E.:  
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 94, 237 (1957)
- 80) Harbers, E.: Strahlentherapie 112, 333 (1960)
- 81) Harbers, E.: Dtsch. med. Wschr. 87, 27 (1962)
- 82) Harbers, E.: Die Nukleinsäuren; 1. Aufl. (Thieme/Stuttgart)
- 83) Nygaard, O.F. and Potter, R.L.: Radiat. Res. 16, 243 (1962)
- 84) Nygaard, O.F. and Potter, R.L.: Radiat. Res. 10, 462 (1959)
- 85) Painter, R.B.: Radiat. Res. 13, 726 (1960)
- 86) Sherman, F.G. and Quastler, H.: Exp. Cell Res. 19, 343 (1960)
- 87) Kelly, L.S., Hirsch, D., Beach, G. and Petrakis, N.L.: Proc.  
Soc. exp. Biol. N.Y. 94, 83 (1957)
- 88) Ord, M.G. and Stocken, L.A.: Nature 182, 1787 (1958)
- 89) Lajtha, L.G., Oliver, R., Kumatori, T. and Ellis, F.:  
Radiat. Res. 8, 1 (1958)
- 90) Van Lancker, J.: Biochim. biophys. Acta 33, 587 (1959)
- 91) Nygaard, O.F. and Potter, R.L.: Radiat. Res. 12, 120 (1960)
- 92) Lajtha, L.G., Oliver, R., Berry, R. and Noyes, W.D.: Nature  
182, 1788 (1958)
- 93) Jaffe, J.J., Lajtha, L.G., Lascelles, J., Ord, M.G. and  
Stocken, L.A.: Int. J. Radiat. Biol. 1, 241 (1959)
- 94) Bishop, C.W. and Davidson, J.N.: Brit. J. Radiol. 30, 367  
(1957)
- 95) Vermund, H., Barnum, C.P., Huseby, R.A. and Stenstrom, K.W.:  
Cancer Res. 13, 633 (1953)
- 96) Lutwak-Mann, C.: Biochem. J. 49, 300 (1951)
- 97) Lutwak-Mann, C.: Biochem. J. 52, 356 (1952)
- 98) Maas, H. und Kunkel, H.A.: Int. J. Rad. Biol. 2, 269 (1960)
- 99) Bessman, M.J., Lehman, I.R., Simms, E.S. and Kornberg, A.:  
J. biol. Chem. 233, 171 (1958)
- 100) Richardson, C.C., Sample, F., Schildkraut, C., Lehman, I.R.  
and Kornberg, A.: Fed. Proc. 22, 349 (1963)
- 101) Pilgrim, Ch. und Maurer, W.: Exp. Cell Res. 37, 183 (1965)
- 102) Palmert, J.G., Kemp, I., Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M.:  
Blood 6, 3 (1951)
- 103) Bücherl, F. und Schwab, M.: Klin. Wschr. 29, 731 (1951)
- 104) Arnold, R.: med. Diss. München (1964)
- 105) Lifshitz, M.: Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 36, 612 (1937)
- 106) Crosby, W.H. and Ruiz, F.B.: Blood 20, 793 (1962)

- 107) Rigler, R. und Rosenkranz, W.: Z. Naturforsch. 13b, 543 (1958)
- 108) von Albert, H.H.: Folia haemat. N.F. 9, 413 (1964)
- 109) Bock, H.E. und Frenzel, B.: Klin. Wschr. 17, 1315 (1938)
- 110) Altman, K.J., Watman, R.N. and Salomon, K.: Nature 168, 827 (1951)
- 111) Loesch, J., Witts, L.J. and Zimmerman, A.: K. J. metab. Res. 6, 297 (1924)
- 112) Wrba, H., Rabes, H. und Rajewsky, M.F.: Naturwissenschaften 49, 376 (1962)
- 113) Jacobson, L.O., Marks, E.K., Gaston, E.O., Robson, M. and Zirkle, R.E.: Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 70, 740 (1949)
- 114) Cole, L.J., Fishler, M.C. and Ellis, M.E.: Radiology 64, 201 (1955)
- 115) Ito, Y. and Weinstein, F.B.: J. nat. Cancer Inst. 29, 229 (1962)
- 116) Maurice, P.A. and Jeanrenaud, A.: Nature 200, 1221 (1963)
- 117) Maurice, P.A. and Jeanrenaud, A.: Brit. J. Haemat. 10, 327 (1964)
- 118) Kurnick, N.B., Massey, B.W. and Sandeen, G.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 61 (1958/59)
- 119) Kurnick, N.B., Massey, B.W. and Sandeen, G.: Radiat. Res. 11, 101 (1959)
- 120) Douglass, C.D. and Day, P.L.: Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 89, 616 (1955)
- 121) Kurnick, N.B. and Nokay, N.: Radiat. Res. 23, 239 (1964)
- 122) Kurnick, N.B. and Nokay, N.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 114, 528 (1964)
- 123) Kowlessar, O.D., Altmann, K.J. and Hempelmann, L.H.: Arch. Biochem. 43, 54 (1954)
- 124) Kowlessar, O.D., Altmann, K.J. and Hempelmann, L.H.: Arch. Biochem. 43, 240 (1953)
- 125) Kowlessar, O.D., Altmann, K.J. and Hempelmann, L.H.: Nature 172, 867 (1953)
- 126) Kowlessar, O.D., Altmann, K.J. and Hempelmann, L.H.: Arch. Biochem. 52, 362 (1954)
- 127) Koszalka, T.R., Schreier, K. and Altmann, K.J.: Biochim. biophys. Acta 15, 194 (1954)
- 128) Hagen, U.: Strahlentherapie 117, 201 (1962)
- 129) Fausto, N., Smoot, A.O. and van Lancker, J.L.: Radiat. Res. 22, 288 (1964)

- 130) Siebert, G., Lang, K., Lucius-Lang, S., Herkert, L., Stark, G., Rossmüller, G. und Jöckel, H.:  
Z. Physiol. Chem. 295, 229 (1953)
- 131) Hagen, U.: Strahlentherapie 106, 277 (1958)
- 132) Roth, J.S., Buskovsky, J. and Eichel, H.J.: Radiat. Res.  
16, 27 (1962)
- 133) Verani, P., Balducci, D., Chibarro, M.A., Chiazotto, M.,  
Perugini, S. and Penso, G.: Experientia  
20, 154 (1964)
- 134) Gostomzyk, J.G., Heidenreich, P. und Ruhenstroth-Bauer, G.:  
Z. Naturforsch. 20b, 926 (1965)
- 135) Limperos, G.: Cancer Res. 11, 325 (1951)
- 136) Limperos, G. and Mosher, W.A.: Amer. J. Roentgenol. 63, 681  
(1950)
- 137) Gostomzyk, J.G., Huhle, C. und Ruhenstroth-Bauer, G.:  
im Druck
- 138) Feeser, C., Gostomzyk, J.G. und Ruhenstroth-Bauer, G.:  
Naturwissenschaften 52, 263 (1965)
- 139) Gostomzyk, J.G., Heidenreich, P., Huhle, C. und Ruhenstroth-  
Bauer, G.: im Druck
- 140) Stodtmeister, R., Fliedner, T.H. und Sandkühler, S.:  
Strahlentherapie 101, 296 (1956)

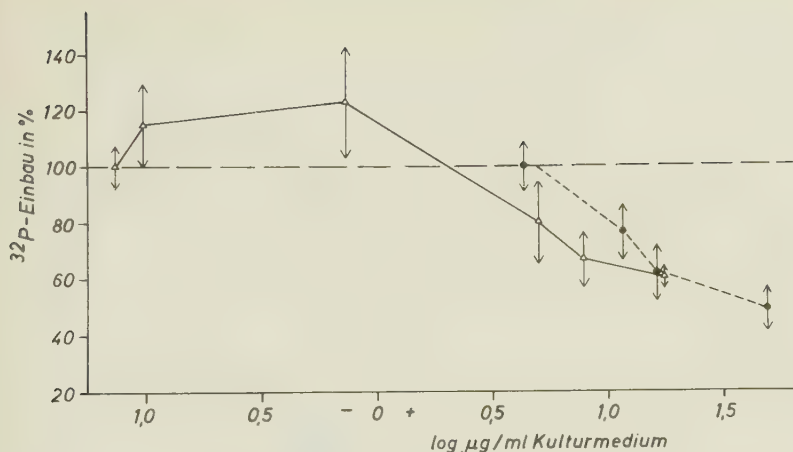


Abb. 1: Die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme von normalem Knochenmark unter Zusatz von Milz- oder Pankreasdesoxyribonuklease zum Kulturmedium nach 15-stündiger Inkubation bei  $37^\circ$  in % der Kontrollwerte. Kontrollwert = 100%.

▲—▲ Pankreasdesoxyribonuklease  
●---● Milzdesoxyribonuklease

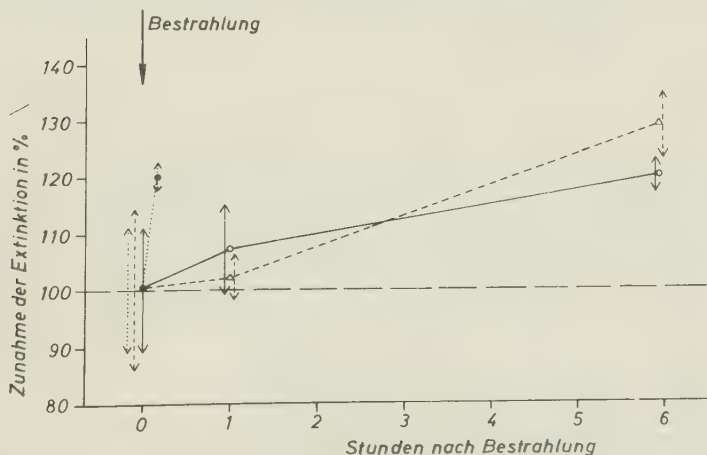


Abb. 2: Bestimmung der sauren Desoxyribonuklease in Plasma und Milzhomogenat von ganzkörperbestrahlten Ratten (800 R) und lokal milzbestrahlten Kaninchen (400 R) zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung. Ordinate: Zunahme der Extinktion im UV-Licht nach 1-stündiger Inkubation mit DNS bei  $37^\circ$ , ausgedrückt in % der Kontrollwerte. Kontrollwert = 100%. Zahlen in Klammern = Anzahl der Versuche.

▲—▲ Rattenplasma, ○—○ Rattenmilz, ●—● Kaninchenmilz

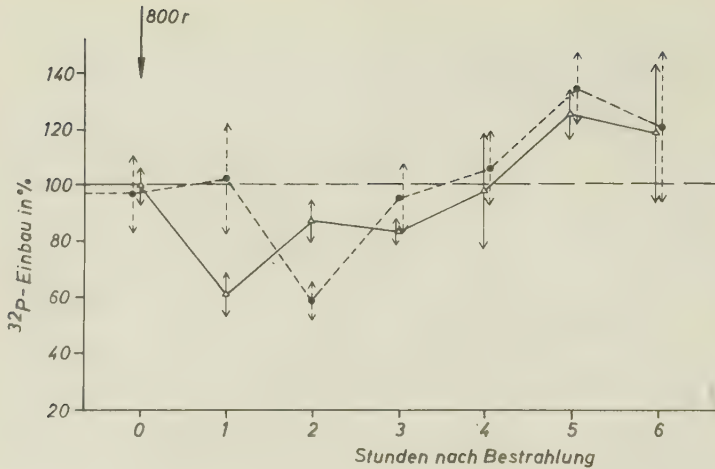


Abb. 3: Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark von normalen Ratten und solchen mit Milzunterbindung zu verschiedenen Zeiten nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R. Kontrollwerte = 100%.

▲—▲ Ganzkörperbestrahlung milznormaler Ratten  
 ●---● Ganzkörperbestrahlung nach Milzunterbindung

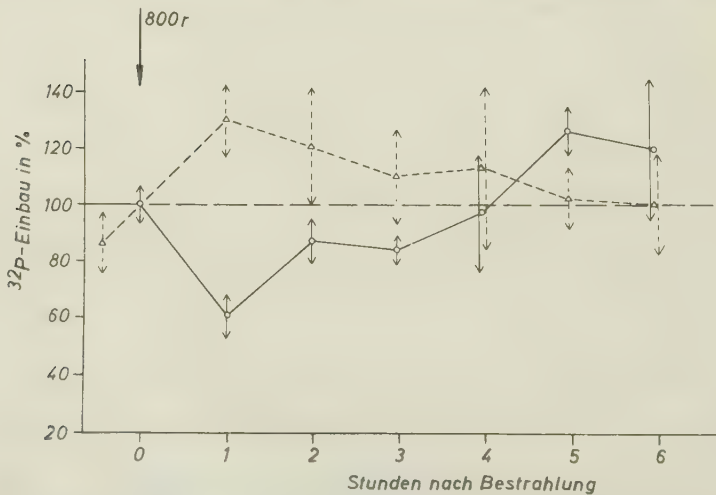


Abb. 4: Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in das Knochenmark normaler ganzkörperbestrahlter und lokal milzbestrahlter Ratten (800 R). Kontrollwerte = 100%.

▲---▲ Lokale Milzbestrahlung  
 ○—○ Ganzkörperbestrahlung

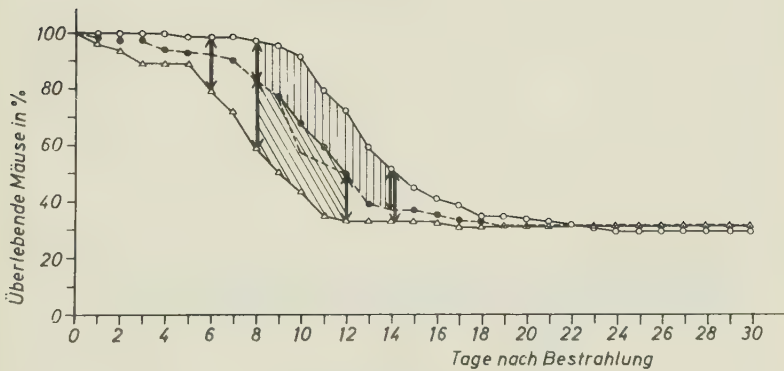


Abb. 5: Die Absterberate von Mäusen, die mit 650 R ganzkörperbestrahlt wurden und 10 mal je 3  $\mu$ g der gereinigten Lipoidfraktion, bzw. je 1 ml des Kochsalzlsg.-Äthanolgemisches injiziert bekamen. Es sind nur die statistisch signifikanten Kurven angegeben. Die Pfeile demonstrieren einen statistisch signifikanten Unterschied.

- 203 Kontrollmäuse
- △—△ 86 Mäuse, unmittelbar nach der Bestrahlung mit der Lipoidfraktion gespritzt.
- 171 Mäuse, unmittelbar nach der Bestrahlung mit Kochsalzlsg.-Äthanolgemisch gespritzt.

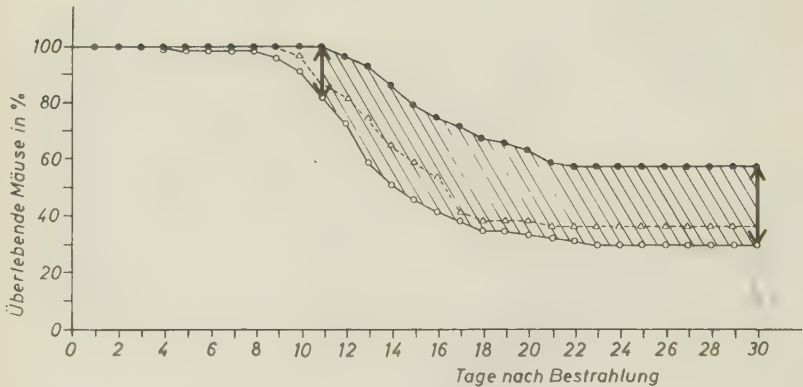


Abb. 6: Die Absterberate von Mäusen, die mit 650 R ganzkörperbestrahlt wurden. Jedes Tier erhielt nur 1 Injektion mit physiologischer Kochsalzlsg.

○—○ 203 Kontrolltiere

△---△ 39 Tiere; 1 Injektion von 3 ml physiol. Kochsalzlsg. unmittelbar nach der Bestrahlung.

●—● { 79 Tiere; 1 Injektion von 1 ml physiol. Kochsalzlsg. unmittelbar nach der Bestrahlung.

{ 40 Tiere; 1 Injektion von 1 ml physiol. Kochsalzlsg. 24 Stunden nach der Bestrahlung.

{ 39 Tiere; 1 Injektion von 3 ml physiol. Kochsalzlsg. 24 Stunden nach der Bestrahlung.

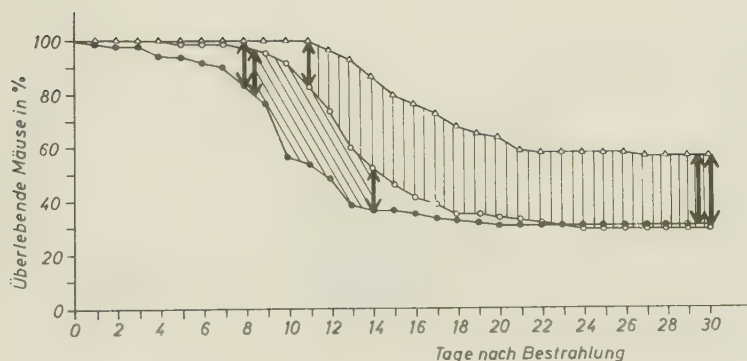


Abb. 7: Die Absterberate von ganzkörperbestrahlten Mäusen (650 R), denen ein Gemisch aus physiol. Kochsalz-  
lsg. und Äthanol oder nur physiol. Kochsalzlösung  
injiziert wurde.

- 203 Kontrolltiere
- 79 Tiere; 1 Injektion von 1 ml physiol.  
Kochsalzlsg. unmittelbar nach  
der Bestrahlung.
- △—△ 171 Tiere; 10 Injektionen zu je 1 ml Koch-  
salzlsg.-Äthanolgemisch. Die  
erste Injektion unmittelbar  
nach der Bestrahlung.

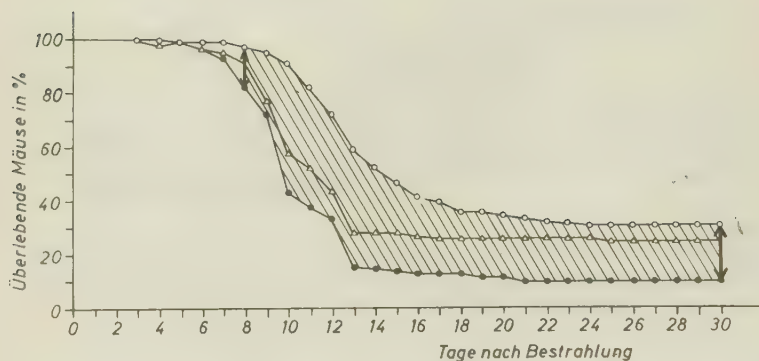


Abb. 8: Die Absterberate von ganzkörperbestrahlten Mäusen (650 R), welche 10 mal je 1 Injektion mit 30  $\mu$ g des in Cyclohexan löslichen Rohmilzextraktes erhielten. Kontrolltiere wurden mit dem Kochsalzlsg.-Äthanolgemisch gespritzt.

○—○ 203 Kontrolltiere

△—△ 84 Tiere; 10 Injektionen mit dem Rohextrakt.

●—● 84 Tiere; 10 Injektionen mit dem Kochsalz-lsg.-Äthanolgemisch.

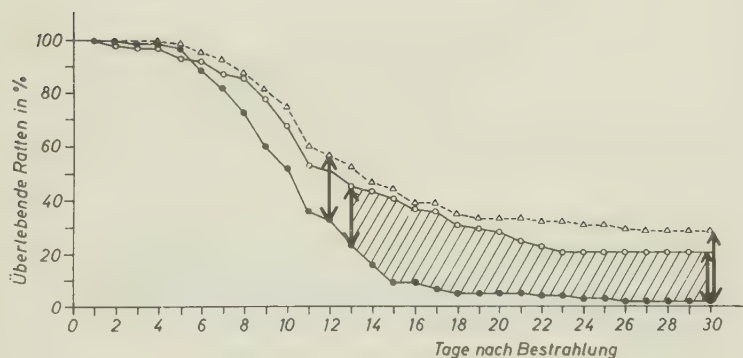


Abb. 9: Die Absterberate von ganzkörperbestrahlten Ratten (650 R), die unmittelbar und am 2. Tag nach der Bestrahlung je 1 Injektion von 10  $\mu$ g der gereinigten Lipoidfraktion injiziert erhielten. Dazu Kontrolltiere, die mit dem Kochsalzls.-Äthanolgemisch gespritzt wurden.

- 75 Kontrolltiere
- 75 Tiere; Injektionen mit der Lipoidfraktion.
- △---△ 75 Tiere; Injektionen mit dem Kochsalzls.-Äthanolgemisch.

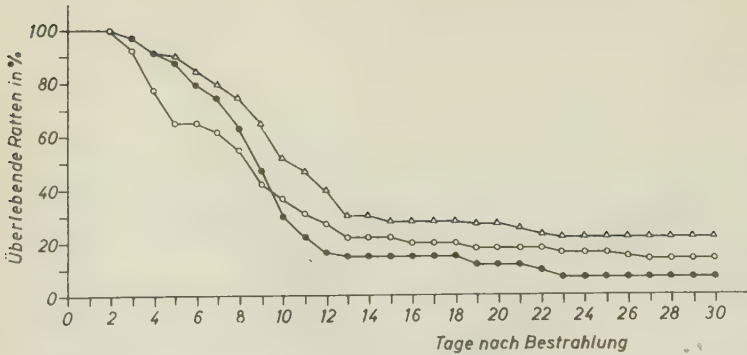


Abb. 10: Die Absterberate von ganzkörperbestrahlten, splenektomierten Ratten (650 R). Die Tiere erhielten unmittelbar und am 2. Tag nach der Bestrahlung je 1 Injektion von 10  $\mu$ g der gereinigten Lipoidfraktion, bzw. des Kochsalzls.-Äthanolgemisches injiziert.

- 55 Kontrolltiere (splenektomiert).
- 60 Tiere; Injektionen mit der Lipoidfraktion.
- △—△ 60 Tiere; Injektionen mit dem Kochsalzls.-Äthanolgemisch.

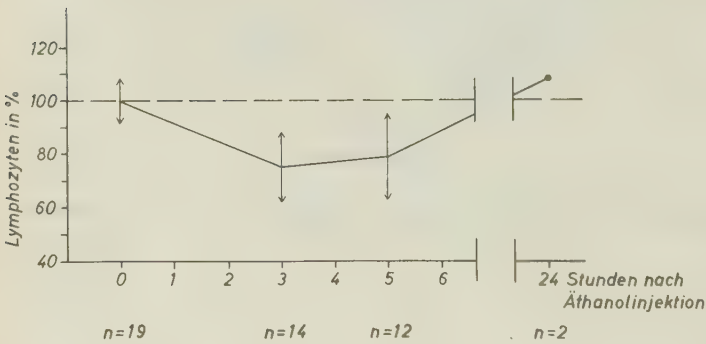


Abb. 11: Die Lymphozytenwerte aus Differentialblutbildern vom Kaninchen. Blutentnahme aus der Ohrvene zu verschiedenen Zeiten nach einer i.-v.-Injektion von 0,2 ml Äthanol (96%) in die Ohrvenen. Kontrollwerte =  $100 \pm 8\%$ . n = Anzahl der Versuche.

### Lebenslauf

Am 14. Dezember 1939 wurde ich als Sohn des Musikers Joseph Heidenreich und seiner Ehefrau Julia, geb. Mayer in München geboren. Nach vierjährigem Besuch der Simmernschule in München wechselte ich im September 1949 auf das humanistische Maximiliansgymnasium in München über, an dem ich im Juli 1959 das Abitur ablegte. Nach einem Jahr Wehrpflichtzeit beim Fernmeldebataillon 1/I in Borken (Westfalen) studierte ich seit dem Wintersemester 1959/60 ununterbrochen an der Universität München Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich nach dem Wintersemester 1962/63 ab. Vom 1. September 1963 an arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie an meiner medizinischen Dissertation. Am 24. Juni 1966 beendigte ich das medizinische Staatsexamen.





